

**OSMAR DIAS FERRAZ JUNIOR**

**PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA DETECÇÃO  
DE ANTICORPOS ANTI-ECG EM RATAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Bruna Waddington de Freitas

Coorientadora: Mariana Machado Neves

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

F381p  
2022 Ferraz Junior, Osmar Dias, 1990-  
Padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para  
detecção de anticorpos anti-eCG em ratas / Osmar Dias Ferraz Junior. -  
Viçosa, MG, 2022.  
1 dissertação eletrônica (62 f.): il.

Inclui anexo.

Orientador: Bruna Waddington de Freitas.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Veterinária, 2022.

Referências bibliográficas: f. 57-61.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.660>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Hormônios. 2. Anticorpos. 3. Gonadotropina coriônica. 4.  
Ovulação - Indução. 5. Enzimas - Regulação. I. Freitas, Bruna  
Waddington de, 1982-. II. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 573.44

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB-6/3317


**OSMAR DIAS FERRAZ JUNIOR**

**PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA DETECÇÃO  
DE ANTICORPOS ANTI-ECG EM RATAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 8 de agosto de 2022.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 OSMAR DIAS FERRAZ JUNIOR  
Data: 10/08/2023 16:51:01-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Osmar Dias Ferraz Junior  
Autor

Documento assinado digitalmente  
 BRUNA WADDINGTON DE FREITAS  
Data: 10/08/2023 10:49:27-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Bruna Waddington de Freitas  
Orientadora

*Aos meus pais, meus avós e a história que me precede...*

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de começar dizendo com orgulho que mais uma etapa foi concluída, que foi difícil chegar até aqui, mas, que valeu a pena cada esforço e cada abdicção. Gostaria de dizer ainda que seria impossível trilhar esse caminho sozinho. Amigos, família, pessoas queridas que preenchem os espaços, que nos dão suporte, que nos empurram para frente.

Primeiramente preciso agradecer a Deus e a Nossa Senhora que sempre estão ao meu lado e sempre me motivam a seguir adiante.

À minha mãe Ana Rosa Furtado, um agradecimento especial. A senhora é um exemplo de mãe, me ensinou a ser uma pessoa melhor, com todo o seu carinho, sua dedicação e seu empenho em me ver crescer. Eu agradeço imensamente a tudo que a senhora fez e faz por mim.

Ao meu pai Osmar Dias Ferraz todo meu amor e respeito, o senhor sempre foi um exemplo para mim, um exemplo de vida e de crescimento profissional. Com toda sua forma de falar e de agir o senhor me ensinou que na vida é necessário trabalhar duro e se dedicar a tudo o que se propor a fazer.

Ao meu irmão Ricardo Furtado dos Reis, essa conquista também é sua. Você sempre provou que o nosso futuro é a gente que faz, você sempre correu atrás de seus objetivos e nunca mediu esforços para se tornar a pessoa que você sabia que queria ser. Então deixo aqui um agradecimento especial por sempre me ajudar com as decisões mais difíceis e me apoiar quando preciso.

Ao Stephen Forry, meu companheiro de vida, todo meu amor e todo meu carinho. Obrigado por sempre estar ao meu lado, por ser o suporte que precisei para fazer o mestrado. Obrigado por me apoiar, por cuidar de mim e por entender o meu estresse e meus momentos de ausência. Obrigado por existir em minha vida.

A todos os outros familiares que de certa forma estiveram lá por mim. A Jéssica, o Lucas, a Maria Luiza, o Luiz, a Duda e todos os meus sobrinhos, muito obrigado por me motivarem a ser uma pessoa melhor. Aos meus padrinhos Aparecida, Luceir e Valquíria e a todos os irmãos que acreditam no meu sucesso e que sempre me incentivaram, os meus agradecimentos.

A todos os amigos que fizeram os meus momentos mais leves ao longo dos anos seja em Viçosa, em Ribeirão Preto ou em Galway. Em especial a Vanessa Hamade, amiga você me salvou sempre, já não consigo contar o número de vezes que você esteve ali por mim. Mesmo distante a nossa amizade não perde o brilho, você tem toda minha confiança, meu amor e meu respeito.

À Ourofino Saúde Animal que foi minha casa por todo o período do mestrado, que acreditou no meu projeto e me deu suporte para realizar. Aqui entra um agradecimento especial ao CPV e ao CPAL e particularmente ao Jeferson, George e Carla, sem vocês tudo seria mais difícil. Muito obrigado à equipe do CQBio, a Aline, a Paulinha e todas as meninas que me acolheram no período do experimento.

Agradeço também aos estagiários que estiveram ao meu lado durante esse período, em especial à Ana Beatriz que além de estagiária se tornou uma grande amiga.

Gostaria de agradecer à professora Bruna, minha orientadora, minha amiga, a pessoa que me escutou, que me incentivou, que esteve ao meu lado, numa orientação difícil, a distância, em meio a pandemia, mas que se mostrou como um ponto de segurança pra mim. Obrigado pelos desafios, pelos ensinamentos e pela amizade.

Gostaria também de agradecer aos meus anjos da guarda. Primeiramente o Gabriel que esteve do meu lado desde a escrita do projeto até a finalização da dissertação, que me motivou e me ensinou muito nesse período, ao Jurandy que foi super solícito quando precisei e a Carol que apareceu na reta final para ser a luz no fim do túnel.

Agradeço à UFV, por ser meu lar, por sempre se mostrar como um ambiente onde eu sou bem vindo, onde os meus pensamentos importam, um lugar onde eu aprendo cada dia mais.

Obrigado ao departamento de veterinária e a pós-graduação. Obrigado Rosi, por sempre ajudar e sempre solucionar os problemas, você é luz.

Agradeço à CAPES, pois o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Por fim representando todos os animais que fazem parte da minha vida, da escolha da minha profissão, do meu aprendizado diário e das minhas pesquisas, eu gostaria de agradecer ao Chico, meu gato, que me ensina todo dia que amar é respeitar o espaço e a individualidade do outro.

*“Success is something between you and yourself. I think only you know where you’ve come from and how far you wanna go.”*

RuPaul Andre Charles

## RESUMO

FERRAZ JR, Osmar Dias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2022. **Padronização de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para Detecção de Anticorpos Anti-eCG em Ratas.** Orientadora: Bruna Waddington de Freitas. Coorientadora: Mariana Machado Neves.

A potência biológica da gonadotrofina coriônica equina (eCG) é estimada, sob condições controladas, a partir do seu efeito sobre a massa dos ovários de ratas imaturas mediante a comparação com o efeito de um agente padrão e com um grupo controle. O aumento de massa ovariana mediante uso da eCG ocorre devido à superovulação induzida em função do efeito agonista da molécula, já que essa apresenta reconhecida capacidade de se ligar aos receptores de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH). O objetivo do presente estudo foi a padronização de uma concentração ótima do formulado de eCG (Padrão internacional PMSG – NZY02) em diferentes concentrações do teste de imunodiagnóstico ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para a detecção da produção de anticorpos anti-eCG em ratas imaturas submetidas a protocolos de superovulação. Foram utilizadas 80 ratas (*Rattus norvegicus*), com diferença de peso entre os animais de no máximo 10 g, que foram distribuídos de forma aleatória em 4 tipos de tratamento (inoculação do formulado padrão internacional PMSG 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL, 26 UI/mL e solução salina). O sangue dos animais foi colhido nos momentos D5, D21 e D28 após a primeira inoculação (D0) e os ovários foram coletados para pesagem nos momentos D5 e D28. O ensaio experimental foi conduzido no Biotério da empresa Ourofino, localizado no Centro Pesquisa Veterinária (CPV), na cidade de Guatapar – SP. Como resultado, os ensaios de padronização do teste ELISA apresentaram elevada sensibilidade na diluição do antígeno em 1/100000 e nas diluições de soro dos animais em 1/100, 1/200 e 1/400. Além disso, foi detectada elevada concentrao de anticorpos anti-eCG nos momentos D21 e D28 nas concentraes 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL e 26 UI/mL. A análise realizada no momento D5 não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle nas concentraes 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL e 26 UI/mL, nas diluições do soro entre 1/100 e 1/6400. Por fim, os animais tratados com o padrão PMSG tanto no momento D5 quanto no momento D28, apresentaram aumento de peso de ovário de forma significativa quando comparado ao grupo controle.

**Palavras-chave:** Gonadotrofina. eCG. ELISA.

## ABSTRACT

FERRAZ JR, Osmar Dias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2022. **Standardization of Enzyme Immunoassay (ELISA) for the Detection of Anti-eCG Antibodies in Rats.** Adviser: Bruna Waddington de Freitas. Co-adviser: Mariana Machado Neves

Equine chorionic gonadotropin (eCG) is compared to the effects of a standard agent and a control group in order to determine its biological potency from its influence on the ovary mass of immature rats under controlled settings. Because eCG has a known affinity for binding to the receptors for luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH), it induces superovulation, which results in an increase in ovarian mass. In order to detect the generation of anti-eCG antibodies in female rats, the current study set out to standardize the optimal concentration of the eCG formulation (PMSG International Standard - NZY02) in various concentrations of the ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) immunodiagnostic test. animals that were too young to undergo superovulation procedures. Eighty rats (*Rattus norvegicus*) were employed, with a maximum weight difference of 10 g between the animals, and they were randomly assigned to 4 types of treatment: injection with the internationally produced standard PMSG 11.57 IU/mL, 17.34 IU/mL, 26 IU/mL, and saline. Following the initial immunization (D0), the animals' blood was obtained at moments D5, D21, and D28, and the ovaries were collected for weighing at moments D5 and D28. The experiment was run in the firm Ourofino's vivarium, which is housed in the Veterinary Research Center (CPV) in Guatapar, SP. Since the antigen was diluted to 1/100000 and the animal serum was diluted to 1/100, 1/200, and 1/400, the standardization tests of the ELISA test revealed great sensitivity. Additionally, at times D21 and D28, large levels of anti-eCG antibodies were found at values of 11.57 IU/mL, 17.34 IU/mL, and 26 IU/mL. When compared to the control group at concentrations of 11.57 IU/mL, 17.43 IU/mL, and 26 IU/mL in serum dilutions between 1/100 and 1/6400, the analysis conducted at time D5 revealed no statistically significant difference. Finally, when compared to the control group, the animals treated with the PMSG pattern both at D5 and D28 time showed a substantial increase in ovarian weight.

**Keywords:** Gonadotropin. eCG. ELISA.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Representação esquemática da diluição do padrão internacional PMSG no ensaio experimental para obtenção das concentrações finais de 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL e 26 UI/mL ..... 30
- Figura 2 - Inoculação subcutânea de padrão internacional PMSG ou solução salina realizada em ratas ..... 31
- Figura 3 - Localização do coração para a realização de punção intracardíaca ..... 33
- Figura 4 - Ovários de ratas retirados no momento D5 que foram inoculadas de forma subcutânea com padrão internacional PMSG ou solução salina ..... 34
- Figura 5 – Diagrama de distribuição das concentrações de 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL, 26 UI/mL do padrão internacional PMSG e grupo controle nos momentos D5, D21 e D28 em placa de 96 wells ..... 36
- Figura 6 - Distribuição da diluição de 1/100 até 1/6400 do soro dos animais e grupo controle em placa de 96 wells ..... 37

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Média e desvio padrão dos peso (g) no momento D5 de 40 ratas heterogêneas inoculadas com padrão internacional PMSG nas concentrações 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL, 26 UI/mL e grupo controle, que foram medidos no início do estudo antes da inoculação (Peso Inicial), e ao final do estudo antes da eutanásia (Peso Final e Peso dos Ovários). \* $p \leq 0.05$ . .42

Gráfico 2 - Média e desvio padrão dos peso (g) no momento D28 de 40 ratas heterogêneas inoculadas com padrão internacional PMSG nas concentrações 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL, 26 UI/mL e Controle, que foram medidos no início do estudo antes da inoculação (Peso Inicial), e ao final do estudo antes da eutanásia (Peso Final e Peso dos Ovários). \* $p \leq 0.05$ .....43

Gráfico 3 - Média e desvio padrão dos pesos (g) dos ovários nos momentos D5 e D28 de 80 ratas heterogêneas inoculadas com padrão internacional PMSG nas concentrações 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL, 26 UI/mL e Controle.....44

Gráfico 4 - Valores de absorvância de anticorpos anti-eCG produzidos por ratas que receberam as concentrações de eCG: Controle (azul), 11,57 UI/mL (vermelho), 17,34 UI/mL (amarelo) e 26 UI/mL (verde), com diluições variadas de 1/100 – 1/6400 e grupo controle. Amostras de sangue coletadas em D5 (A), D21 (B) e D28 (C).....45

Gráfico 5 - Momento D5, D21 e D28. Valores de absorvância (proporcional a quantidade de anticorpos anti-eCG) nas diferentes concentrações: controle, 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL e 26 UI/mL. As amostras de sangue final e ovários foram coletadas dos animais nos momentos D5, D21 e D28. \* $p \leq 0,05$ . ..... 52

Gráfico 6 - Momentos D5, D21 e D28. Valores de absorvância de anticorpos anti-eCG nas diferentes concentrações: Grupo controle, 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL e 26 UI/mL.....54

Gráfico 7 - Média da absorvância das amostras positivas e negativas para o ELISA.....54

Gráfico 8 - Amostras avaliadas pelo ELISA indireto qualitativo. Negativas: amostras negativas utilizadas no cálculo do cut off. Positivas: amostras positivas utilizadas na a validação do teste.. .....55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Ensaio de padronização de ELISA, com os valores de absorvância de anticorpos anti-eCG produzidos por ratas sacrificadas no momento D5, que receberam as concentrações de eCG: 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL, 26 UI/mL e controle, com diluições do anticorpo anti eCG de 1/5000, 1/10000 e 1/25000. ....	39
Tabela 2- Ensaio de padronização de ELISA, com os valores de absorvância de anticorpos anti-eCG produzidos por ratas sacrificadas no momento D5, que receberam as concentrações de eCG: 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL, 26 UI/mL e controle, com diluições do anticorpo anti eCG de 1/50000, 1/75000 e 1/100000. ....	40
Tabela 3 - Ensaio de confirmação da padronização de ELISA, com os valores de absorvância de anticorpos anti-eCG produzidos por ratas, que receberam as concentrações de eCG: 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL, 26 UI/mL e controle, com diluições do anticorpo anti eCG selecionada de 1/100000. ....	41
Tabela 4 - Cálculo do coeficiente de variação e pesagem do grupo D5.....	46
Tabela 5 - Cálculo do coeficiente de variação e pesagem do grupo D28.....	46
Tabela 6 – Comparações múltiplas do momento D5. Valores de absorvância (proporcional a quantidade de anticorpos anti-eCG) nas diferentes concentrações: controle, 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL e 26 UI/mL.....	48
Tabela 7 – Comparações múltiplas do momento D21. Valores de absorvância (proporcional a quantidade de anticorpos anti-eCG) nas diferentes concentrações: controle, 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL e 26 UI/mL.....	49
Tabela 8 – Comparações múltiplas do momento D21. Valores de absorvância (proporcional a quantidade de anticorpos anti-eCG) nas diferentes concentrações: controle, 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL e 26 UI/mL.....	50
Tabela 9 – Comparações múltiplas dos momentos D21 e D28. Valores de absorvância (proporcional a quantidade de anticorpos anti-eCG) nas diferentes concentrações: controle, 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL e 26 UI/mL.....	51

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1- Organização dos grupos de ensaio. ....	31
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APC – Células Apresentadoras de Antígenos
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- CPAL – Centro de Pesquisa com Animais de Laboratório
- CPV – Centro de Pesquisa Veterinária
- CQBio – Controle de Qualidade Biológicos
- DBCA – Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais
- DO – Densidade Óptica
- E<sub>2</sub> – Estradiol
- eCG – do inglês *Equine Chorionic Gonadotropin*
- ELISA – do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- FSH – Hormônio Folículo Estimulante
- GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
- hCG – Gonadotrofina Coriônica Humana
- HVAC – do inglês *Heating, Ventilation and Air Conditioning*
- IA – Inseminação Artificial
- IATF – Inseminação Artificial em Tempo Fixo
- IVC – do inglês *Intra Ventilated Cages*
- LH – Hormônio Luteinizante
- MHC – Complexo de Histocompatibilidade
- NA – Não se Aplica
- NK – do inglês *Natural Killer*
- P<sub>4</sub> – Progesterona
- PG F<sub>2α</sub> – Prostaglandina F<sub>2α</sub>
- PMSG – do inglês *Pregnant Mare Serum Gonadotropin*
- RIA – Técnica de Radioimunoensaio
- SC – Subcutânea
- TCR – do inglês *T-cell receptor*
- TE – Transferência de Embriões
- UFV – Universidade Federal de Viçosa

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
<b>2.1 Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG)</b> .....	17
<b>2.1.1 Aspectos moleculares</b> .....	17
<b>2.1.2 Produção da molécula</b> .....	18
<b>2.1.3 Utilização da molécula em protocolos hormonais</b> .....	19
<b>2.1.4 Potência imunogênica</b> .....	21
<b>2.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</b> .....	24
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	27
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	27
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	27
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
<b>4.1 Aspectos éticos no uso de animais</b> .....	28
<b>4.2 Local e período de realização do estudo</b> .....	28
<b>4.3 Origem e destino dos animais</b> .....	28
<b>4.4 Ambiente e manejo dos animais</b> .....	28
<b>4.5 Preparo e diluição das amostras</b> .....	29
<b>4.6 Delineamento experimental</b> .....	30
<b>4.7 Protocolo anestésico e analgésico</b> .....	32
<b>4.8 Método de eutanásia</b> .....	32
<b>4.9 Colheita de material biológico</b> .....	32
<b>4.10 Processamento e armazenamento das amostras</b> .....	33
<b>4.11 ELISA indireto para diagnóstico sorológico</b> .....	35
<b>4.11.1 Padronização do teste</b> .....	36
<b>4.12 Análise estatística</b> .....	38
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	39
<b>5.1 Padronização do teste ELISA</b> .....	39
<b>5.2 Análise do peso dos animais tratados</b> .....	41
<b>5.3 Análise do teste ELISA padronizado</b> .....	47
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	56
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	57
<b>ANEXO I</b> .....	62

## 1. INTRODUÇÃO

A Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) é uma glicoproteína sintetizada e secretada pelos cálices endometriais de éguas gestantes entre 40 e 130 dias de gestação (ALLEN; MOOR, 1972; MURPHY; MARTINUK, 1991). Trata-se de um hormônio composto por duas subunidades (subunidade  $\alpha$  e subunidade  $\beta$ ) que são necessárias para a completa atividade molecular. Além disso, devido ao alto peso molecular, o hormônio tem difícil filtração glomerular, o que contribui para a sua meia-vida longa (PIERCE; PARSONS, 1981).

A eCG apresenta atividade tanto como hormônio luteinizante (LH) quanto como hormônio folículo estimulante (FSH) em fêmeas mamíferas que não sejam da espécie equina (STEWART; ALLEN; MOOR, 1976). Este fato torna essa molécula amplamente utilizada em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), protocolos de superovulação e transferência de embriões (TE), principalmente na espécie bovina (BARUSELLI et al., 2004).

A eCG apresenta efeito positivo em rebanhos com baixa taxa de ciclicidade em animais recém-paridos, em animais com condição corporal comprometida e em animais que apresentam comprometimento no crescimento do folículo dominante devido a altos níveis de progesterona ao final do tratamento de sincronização da ovulação (SALES et al., 2015).

Fêmeas bovinas tratadas com eCG podem, após sucessivas aplicações dessa molécula em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo ou protocolos de superovulação, se tornar refratárias, ou seja, resistentes aos efeitos esperados (JAINUDEEN et al., 1966; AYRES et al., 2008). Isso pode significar que a falta de resposta após o uso contínuo desse hormônio esteja relacionada à resposta imunológica gerada. Por se tratar de um hormônio com alto peso molecular, que possui origem heteróloga e um alto nível de glicosilação, a eCG é considerada uma molécula potencialmente imunogênica (DRION et al., 2001a).

Para os testes de potência (atividade biológica) da eCG, é realizada comparação, sob condições controladas, do seu efeito no aumento da massa dos ovários de fêmeas imaturas de rato com o efeito de um padrão (amostra de eCG com potência conhecida) e com um grupo controle inoculado unicamente com o diluente, sem produto (COMBARNOUS et al., 2019). Porém são poucos os dados na literatura internacional relacionados à atividade imunogênica dessa molécula.

Os bioensaios têm maior variabilidade em comparação a análises físicas e químicas, pois estes são realizados utilizando-se animais, células ou biomoléculas. A variação das respostas biológicas deve ser minimizada tanto quanto possível e sua avaliação deve ser consideravelmente precisa e confiável, obedecendo a padrões para efetivamente controlar a

qualidade do produto. Diferentes análises de controle de qualidade devem ser projetadas para testar diferentes formulações concebidas. Nesse sentido, o presente estudo tem como objetivo correlacionar resultados obtidos frente os testes de potência de formulados comerciais de eCG e seus efeitos imunogênicos em ratas.

Visando a utilização racional de animais em experimentos e a continuidade do uso do modelo animal nessas avaliações, diversas metodologias alternativas já foram e continuam sendo implementadas. Trata-se de um processo complexo que abrange o desenvolvimento, a avaliação de sua relevância e de sua confiabilidade até a aceitação e adoção por diversas organizações regulatórias e Comitês Internacionais (O'DONOVAN; MADDEN, 2018).

Para a quantificação da atividade biológica de eCG (estudo de potência), a *Pharmacopeia* Europeia orienta que o ensaio experimental da gonadotrofina seja realizado em ratas imaturas, as quais são inoculadas com três concentrações distintas da eCG, de forma que as concentrações sejam crescentes e obedeçam uma progressão geométrica entre elas. Os animais devem receber as inoculações em 6 momentos distintos: 0h (T0), 18h (T18), 21h (T21), 24h (T24), 42h (T42) e 48h (T48). A eutanásia e avaliação da bioatividade da molécula de eCG deve ser realizada entre 48h e 72h após a última inoculação. Após a eutanásia, por comparação da massa ovariana com o grupo padrão, é estimada a potência da eCG da amostra teste.

Para o presente estudo foi avaliada a resposta imunológica produzida por essa molécula a partir da quantificação de anticorpos anti-eCG antes da eutanásia das ratas tratadas. A intenção dessa análise é a padronização do teste de imunodiagnóstico ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), um ensaio imunoenzimático, que consiste em uma reação antígeno-anticorpo para avaliar a resposta imunológica de animais ou células pela presença de um anticorpo-alvo específico, visando a proposição de teste alternativo de potência biológica baseado em teste sorológico, o que dispensaria a colheita de material *post-mortem* de animais experimentais.

Atendendo o princípio dos 3 R's (*Reduce, Replace and Refinement*) que regem o uso de animais em pesquisas científicas, a elaboração de teste de potência alternativo também pode contribuir para a redução no uso de outras espécies, como ruminantes (espécie alvo).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG)

A eCG é um hormônio produzido pelos cálices endometriais presentes na placenta de égua gestante a partir de 40 dias de gestação. Sua secreção é mantida até aproximadamente 120 dias de gestação e tem como função a luteinização folicular para formação de corpos lúteos acessórios (CLEGG et al., 1962). Sua função biológica foi descrita há 90 anos por Cole & Hart (1930) ao administrarem soro de éguas gestantes em ratas e camundongos fêmeas impúberes. Esses autores observaram aumento na massa ovariana e importantes alterações histológicas naquelas fêmeas que receberam o soro de éguas com 37 até 131 dias de gestação, sendo que entre os dias 43 e 80, a resposta ovariana era mais intensa. Cole & Erway (1941) foram capazes de separar o elemento que estimulava a ovulação nos animais de laboratório, o qual ficou conhecido como *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG). Nesse mesmo estudo, os autores conseguiram provar que se tratava de uma gonadotrofina presente no soro retirado de éguas gestantes.

Em um primeiro momento, Catchpole & Lyon (1934) acreditaram se tratar de um hormônio hipofisário equino. Posteriormente, porém, foi descoberto que o sítio de produção desse hormônio seria nos cálices endometriais (COLE; GOSS, 1943; CLEGG; BODA; COLE, 1954), que consistem em placas de formatos circulares, de cores claras e de desenvolvimento endometrial no corno gravídico de éguas gestantes, próximo à membrana coriônica (MOOR; ALLEN; HAMILTON, 1975). Os cálices endometriais aparecem aproximadamente no 37º dia de gestação, antes do alantocórion se fixar ao epitélio uterino (GINTHER, 1979). Com base na origem trofoblástica coriônica, o nome *equine Chorionic Gonadotropin* (eCG) foi considerado mais apropriado do que PMSG para descrever a glicoproteína produzida pelos cálices endometriais (CLEGG; BODA; COLE, 1954).

#### 2.1.1 Aspectos moleculares

Trata-se de uma molécula de origem heteróloga, com alto nível de glicosilação e alto peso molecular, características que estão diretamente relacionadas ao seu potencial imunogênico (DRION et al., 2001b). Além disso, possui meia vida longa, de aproximadamente seis dias na espécie equina e até 15 dias na espécie bovina (ALLEN; MOOR, 1972; DRION et al., 2001b). O fato de ser uma molécula carregada negativamente também contribui para que

tenha uma meia vida longa, uma vez que este fato dificulta a sua filtração glomerular e mantém seus níveis séricos por tempo prolongado (LEGARDINIER et al., 2005).

A molécula de eCG tem aproximadamente 45 kDa e é composta por duas subunidades,  $\alpha$  e  $\beta$ , que são heterogêneas e ligadas de maneira não-covalente entre si. Cerca de 47% da molécula é composta por carboidrato, sendo o N-acetil neuramina ou ácido siálico o principal deles e que primordialmente está presente na subunidade  $\beta$  (PAPKOFF; SAMY, 1967; PIERCE; PARSONS, 1981; CAHOREAU; COMBARNOUS, 1987; DRION et al., 2001b). Já a subunidade  $\alpha$  é composta por 96 aminoácidos e comum aos hormônios LH, FSH e TSH; inclusive o hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana) compartilha a mesma subunidade  $\alpha$  que os hormônios hipofisários, enquanto a subunidade  $\beta$  difere entre os hormônios. Em geral é aceito que essa subunidade  $\beta$  seja responsável pelo diferencial de ação dessa molécula (PAPKOFF; SAMY, 1967; PIERCE; PARSONS, 1981; PRATA et al., 2014).

### 2.1.2 Produção da molécula

A obtenção e purificação da gonadotrofina coriônica equina é realizada nas chamadas 'fazendas de sangue'. Quando as éguas chegam próximo do dia 40 de gestação, pequenas quantidades de sangue são colhidas para testagem de eCG sérico realizada por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Uma vez o teste apresente resultado positivo, grandes volumes de sangue passam a ser coletados uma vez por semana entre os dias 40 e 120 de gestação (ALLEN; STEWART, 1993; HOPPEN, 1994).

Vários fatores relacionados a égua gestante e ao feto podem influenciar na quantidade de eCG produzida durante a gestação. O tamanho da égua por exemplo é um fator determinante, quanto maior o animal maior a produção de eCG, independentemente do tamanho do feto (ALLEN et al., 2002). Além disso, o número de gestações que a égua já teve também influencia na quantidade de eCG produzido. Em estudo conduzido por Wilsher & Allen (2011) foi observado um declínio de 38% na produção de eCG entre a 3a e a 5a gestação. No mesmo estudo os autores perceberam que éguas que praticavam exercícios e estavam em boa condição de escore corporal produziam uma quantidade maior da molécula do que animais que não se exercitavam.

Não existem diretrizes internacionais que recomendem ou fiscalizem a coleta de sangue de éguas gestantes, tanto no que diz respeito à quantidade máxima que pode ser coletada quanto à frequência em que essa colheita pode ser realizada. Em algumas fazendas que realizam a colheita e purificação da molécula é realizado o aborto das éguas após 90 dias de gestação,

levando em consideração que a partir desta data a gestação não é mais necessária para continuar as colheitas de sangue e com isso são capazes de realizar dois ciclos de colheita de eCG por ano. Outras fazendas seguem com as gestações e criam os potros para a venda, dependendo do país e da raça escolhida para a inseminação das éguas (MANTECA VILANOVA et al., 2019).

Por razões éticas, num futuro próximo, a eCG recombinante irá substituir a eCG natural obtida a partir do soro sanguíneo de éguas prenhes (RAFERT et al., 2016). Os testes em animais ou in vivo por enquanto são indispensáveis, devido ao polimorfismo da molécula de eCG (CAHOREAU; COMBARNOUS, 1987).

### **2.1.3 Utilização da molécula em protocolos hormonais**

As técnicas reprodutivas estão cada vez mais disseminadas nos rebanhos bovinos do mundo todo. A mais comum é a inseminação artificial (IA) e sua utilização traz grandes vantagens para os produtores em função da possibilidade do uso de sêmen de touros superiores, o que proporciona maior qualidade ao rebanho e uniformidade dos bezerros produzidos (BARUSELLI et al., 2018). O programa de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), surgiu como uma possibilidade de melhoria da técnica de IA, eliminando assim a necessidade de detecção de estro e aumentando a eficiência reprodutiva do rebanho (BARUSELLI et al., 2018).

Em meados dos anos 90, equipes de universidades da Florida e de Wisconsin, nos Estados Unidos, desenvolveram um protocolo experimental de sincronização de ovulação, o qual permitiria a inseminação artificial de rebanhos em tempo pré-estabelecido, o que eliminaria a necessidade de observação de cio. Esse protocolo, precursor da IATF, ficou conhecido como *Ovsynch* (WOLFENSON et al., 1994; PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995) e consiste na aplicação de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) visando a indução de ovulação ou regressão (atresia) do folículo dominante, com início de uma nova onda folicular, seguida da aplicação de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  (PG  $F_{2\alpha}$ ) 7 dias após e 48 horas antes de uma nova aplicação de GnRH, na intenção de causar luteólise, na ocasião da presença de corpo lúteo, com indução de pico de LH, objetivando a ovulação do folículo dominante. Nesse protocolo a IA é realizada 16 horas após a segunda aplicação de GnRH.

Com o passar dos anos, os protocolos de IATF evoluíram, conforme o desenvolvimento de novas formulações hormonais e conhecimento fisiológico. No Brasil, se popularizou o uso do estradiol ( $E_2$ ) e progesterona ( $P_4$ ) (BARUSELLI et al., 2004; VASCONCELOS; VILELA; SÁ FILHO, 2009). A aplicação de outras formulações depende diretamente da relação custo-benefício suportado pela propriedade em função da categoria

manejada e das condições corporais e nível de ciclicidade dos animais protocolados.

Baruselli et al. (2004) observaram que a aplicação da molécula de eCG durante os protocolos de IATF em novilhas *Bos indicus* aumentava a taxa de ovulação dessas fêmeas. Sá Filho et al. (2010) observaram aumento nas taxas de ovulação e de crescimento folicular em vacas tratadas com 400 UI de eCG após a retirada do implante de P<sub>4</sub> nos protocolos de IATF.

Em estudo comparativo entre os efeitos de duas diferentes doses de eCG (200 UI e 400 UI) em protocolo de IATF à base de progesterona e associado à desmama temporária, foi observado que não houve aumento dos índices reprodutivos avaliados, independente do tratamento (SÁ FILHO et al., 2009). Tais resultados foram ponderados pelos autores à desmama temporária, que estimula pulsos de LH de maneira tal que não haja necessidade de suporte gonadotrófico com eCG na fase final do desenvolvimento folicular.

Por outro lado, Meneguetti & Miguel Jr. (2008) observaram aumento na taxa de concepção de novilhas cíclicas que foram submetidas a protocolos de IATF à base de P<sub>4</sub> associada à eCG nas doses de 200 UI e 400 UI. Esses autores sugeriram que a eCG teria capacidade de estimular a fase final de desenvolvimento folicular, que, neste caso, poderia estar sendo inibido por altas concentrações de progesterona sérica.

De fato, segundo Peres et al. (2009), a utilização de eCG pode minimizar qualquer efeito negativo das altas concentrações de P<sub>4</sub> encontradas em novilhas púberes e vacas não lactantes submetidas a protocolos de IATF. Em contradição, os resultados obtidos por esses autores evidenciaram que não existe efeito aditivo da eCG sobre as taxas de ovulação e concepção e que, desse modo, a aplicação de PGF<sub>2α</sub> 48 horas antes da retirada do dispositivo de P<sub>4</sub> seria suficiente para garantir elevadas taxas de concepção.

Em estudo conduzido por Prata et al. (2014), foi observado o efeito do tratamento utilizando 400 UI de eCG no D7 do protocolo de IATF, sendo feita a retirada do dispositivo intravaginal de P<sub>4</sub> no D8, em vacas mestiças (*Bos taurus* x *Bos indicus*). Nesse estudo, os autores observaram aumento na taxa de prenhez, evidenciando que a utilização de 400 UI de eCG pode ser realizada com sucesso em protocolos de IATF em vacas mestiças.

De acordo com Mello et al. (2014), a importância da IATF se deve ao fato dessa biotécnica poder ser utilizada em vacas em período de anestro, antecipando a ovulação pós-parto e otimizando a eficiência reprodutiva do rebanho. Dentro dessas condições, as pesquisas evidenciam a importância do uso da eCG para aumento das taxas de crescimento folicular, ovulação e de prenhez após o tratamento de sincronização, melhorando a eficiência dos protocolos de sincronização para IATF.

## 2.1.4 Potência imunogênica

### 2.1.4.1 Resposta e memória imunológicas

De acordo com Abbas & Lichtman (2004), o sistema imune é composto por um conjunto de órgãos, células e moléculas que, de maneira coordenada, reagem à entrada de qualquer substância estranha no organismo. Isso ocorre para garantir a homeostase. Segundo os autores, os mecanismos de defesa do organismo se classificam em imunidade inata e imunidade adquirida. Naturalmente este sistema deve agir contra agentes patógenos, porém, mesmo substâncias não infecciosas podem estimular uma resposta imunológica.

A imunidade inata fornece a primeira linha de defesa do organismo, agindo imediatamente após o contato com microrganismos em geral, da mesma maneira em cada exposição. Ela é formada por barreiras físicas e químicas como, por exemplo, o epitélio e os agentes antimicrobianos produzidos nas superfícies epiteliais, além de células fagocíticas como neutrófilos e macrófagos, células *natural killers* (NK), células linfoides e proteínas sanguíneas. Estes mecanismos de defesa estão em vigor mesmo antes do contato com os agentes infecciosos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014).

Se opondo à imunidade inata, a imunidade adquirida ou adaptativa é estimulada pelo contato com os chamados antígenos que são os agentes capazes de gerar uma resposta imune adquirida. A resposta imune se adapta a cada tipo de antígeno de forma única e exclusiva; além disso, se torna mais forte e mais ágil cada vez que uma nova exposição ao mesmo agente acontece. Ela é composta pelos linfócitos e seus produtos secretados, tais como anticorpos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014). A imunidade adquirida depende de um tempo após exposição ao antígeno para que os linfócitos e os anticorpos comecem a se tornar eficazes. Porém, eles persistem no organismo, a chamada memória imunológica, que é rapidamente ativada em casos de reexposição ao mesmo antígeno (KINDT; GOLDBSBY; OSBORNE, 2007).

A resposta imunológica adquirida é classificada em resposta mediada por células, que é constituída basicamente pelos linfócitos T, e resposta mediada por moléculas, também conhecida como imunidade humoral, que é constituída por linfócitos B. A principal função dos linfócitos B é produzir anticorpos, que por sua vez, reconhecem os antígenos e neutralizam sua infectividade; a imunidade humoral é a mais efetiva contra microrganismos livres e suas toxinas. Já os linfócitos T têm como principal função a destruição de microrganismos fagocitados ou provocam a morte de células infectadas para eliminar os reservatórios. Além

disso, os linfócitos T ainda contribuem para a eliminação de microrganismos circulantes através do recrutamento de leucócitos e auxiliando os linfócitos B na produção de anticorpos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014).

Para auxiliar os linfócitos T no reconhecimento de antígenos, uma vez que estas células são incapazes de reconhecê-los sozinhas, as células apresentadoras de antígenos (APC) ingerem e digerem os antígenos, fragmentando nos chamados peptídeos antigênicos que se ligam às moléculas do MHC (complexo de histocompatibilidade principal). A partir daí são então apresentados aos linfócitos T na forma de MHC/peptídeo e são reconhecidos pelos TCR, que são os receptores das células T (INABA et al., 1998).

A criação de uma ligação estável entre o complexo MHC/peptídeo e o TCR depende diretamente da afinidade entre eles (GRAKOUUI et al., 1999). Dessa maneira, a variedade de TCR disponível influencia diretamente no produto dessa ligação; dessa forma, o grau de diferenciação e desempenho dos linfócitos T, bem como a qualidade da resposta gerada pelos linfócitos B, dependem diretamente de dois fatores muito importantes, que são a intensidade e duração do estímulo de TCR (IEZZI; KARJALAINEN; LANZAVECCHIA, 1998).

Abbas, Lichtman e Pillai (2015) afirmam que, depois de ativados, os linfócitos B se fragmentam de forma vigorosa, diferenciando-se em plasmócitos que passam a secretar quantidades significativas de anticorpos, que por sua vez, são capazes de neutralizar os antígenos, causando sua destruição por meio de enzimas providas do sistema do complemento ou por fagócitos. Os mesmos autores afirmam ainda que, enquanto os linfócitos T agem primariamente por interações celulares diretas e localizadas na infecção, os linfócitos B possibilitam uma proteção sistêmica graças aos anticorpos que podem ser transportados na circulação sanguínea ou linfática.

Algumas células do sistema imunológico completam sua diferenciação na medula óssea e outras atingem esse estágio após entrar na corrente sanguínea. Já em outra via, os linfócitos apenas se diferenciam quando há o reconhecimento de um antígeno específico, com isso existe uma grande quantidade de linfócitos maduros na corrente sanguínea não diferenciados. Ou seja, que ainda não se depararam com seu antígeno, estes são chamados de células *naive* (ABBAS; LITCHMAN, 2004).

Alguns linfócitos B e T se transformam em células de memória durante o processo de multiplicação celular. Estas células de memória irão permanecer na circulação sanguínea de maneira longínqua, algumas por muitos anos e em caso de uma nova exposição ao mesmo antígeno garantem que haja uma resposta mais rápida e mais eficiente (ADA; NOSSAL, 1987; SPRENT, 1994). As células de memória se multiplicam de maneira mais rápida e precisam de

menor co-estimulação do que as células *naive*. Além disso, em um segundo encontro com o antígeno irão existir um número maior de células de memória do que células *naive* (GRAY; SPRENT, 1990; GRAY, 1993; MACKAY, 1993).

#### **2.1.4.2 Resposta imune à eCG**

Devido ao seu alto peso molecular, origem heterogênea e a alta porcentagem de carboidratos presentes, a molécula de eCG é potencialmente imunogênica (SWANSON et al., 1996; DRION et al., 2001b). A eCG pode produzir resposta imunológica variável quando aplicada em diferentes espécies, como em vacas ou em ratas por exemplo, graças ao grande sítio antigênico presente na molécula, conforme evidenciado por imunomapeamento realizado com anticorpos monoclonais por Chopineau et al. (1993).

Em estudo conduzido por Jainudeen (1966) foi observada redução na atividade ovariana de ratas tratadas com eCG que receberam soro proveniente de vacas tratadas com o hormônio; porém, quando se aplicava nas ratas o soro retirado de vacas que não passaram por nenhum tratamento hormonal, a resposta ovulatória não sofria interferência. Baseado nestes dados, o autor levantou a hipótese de que a refratariedade às gonodotrofinas exógenas poderia ser causada por resposta imune. Sua hipótese foi comprovada em 1979, quando Roser et al. comprovaram a formação de anticorpos anti-hCG em éguas quando submetidas repetitivamente a tratamentos com hCG.

Quando inoculada em coelhos em diferentes doses, a eCG somente induz a resposta imunológica depois da sexta aplicação no mesmo animal e essa resposta é diretamente proporcional a dose inoculada, pode-se dizer ainda que não há diferença entre a prole gerada no primeiro protocolo de inseminação artificial para o sexto protocolo onde já teria uma formação de anticorpos anti-eCG, ou seja, nesse caso os anticorpos não inibem a ação esperada da molécula de eCG nos protocolos de IA (THEAU-CLÉMENT et al., 2008).

Quando aplicada em cabras a eCG induz uma resposta imunológica dependente da concentração utilizada da molécula e do número de aplicações. Assim sendo, a formação de anticorpos anti-eCG pode causar a resistência ao tratamento com o hormônio quando aplicado em altas dosagens e de maneira repetitiva em protocolos reprodutivos realizados em animais não equinos (KOSTYK et al., 1978; LEA; BOLTON, 1991; DRION et al., 2001b).

Drion et al. (2001) observaram que a produção de anticorpos anti-eCG em vacas após a administração do mesmo tratamento por no mínimo três vezes e em doses semanais foi variada e não manteve um padrão, com alguns animais apresentando níveis basais de anticorpos

enquanto outros tinham altas concentrações durante todo o experimento.

A variação da resposta imunológica contra a eCG já havia sido descrita em 1999 por Roy e colaboradores, em estudo realizado com cabras, onde foram divididas em dois grupos sendo um tratado pela primeira vez com eCG e um outro grupo onde as fêmeas já haviam sido tratadas anteriormente, neste estudo foi possível observar que os dois grupos desenvolveram anticorpos anti-eCG, porém, entre os animais do grupo que já havia sido tratado anteriormente essa resposta imune aconteceu de forma mais rápida e o declínio no número de anticorpos demorou mais para acontecer. As diferenças nas concentrações de anticorpos anti-eCG foram notáveis, variando de 0,7 a 102,0 µg/mL no grupo tratado pela primeira vez com a molécula e de 3,0 a 219,0 µg/mL no grupo que já havia sido tratado anteriormente.

A investigação de cabras submetidas aos protocolos anuais utilizando eCG por quatro anos, evidenciaram que as variações nas concentrações plasmáticas de anticorpos anti-eCG estão diretamente ligadas a características de cada indivíduo e que essas diferenças poderiam ser explicadas por diferenças no MHC, que está envolvido na moderação da resposta imunológica (ROY et al., 1999).

Em estudo realizado em ovelhas, Bodin et al., (1997) observaram que quando tratadas com 500 a 550 UI de eCG na parte final do protocolo de sincronização, esses animais apresentam algum efeito residual causado pelo tratamento com eCG. Mesmo um ano após o tratamento foi possível identificar anticorpos anti-eCG nesses animais.

Em estudo utilizando fêmeas bovinas, foi possível observar que a resposta imunológica gerada não influencia na eficácia da utilização de eCG na dose de 400 UI em protocolos de IATF utilizados em fazendas de gado de corte. O experimento mostrou que a produção de anticorpos é dose-dependente e que utilizando uma dose mais baixa como a de 400 UI irá gerar uma resposta imunológica menor e que aparentemente não influencia na atividade biológica da eCG (MANTOVANI, 2010).

A mesma autora Mantovani (2010) observou que em protocolos de superovulação em vacas onde se utiliza uma dose de 2000 UI, levando em conta tratamentos consecutivos, a eficácia da atividade biológica da molécula pode ser comprometida devido a resposta imune com alta produção de anticorpos.

## **2.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

A partir da observação da adsorção do antígeno e do anticorpo em uma superfície sólida e da capacidade de realizar ligações específicas de alta afinidade, foram desenvolvidos

os primeiros testes imunoenzimáticos ou *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) no final da década de 1960 (NUNES, 2005). Anteriormente, os testes imunológicos eram realizados com a técnica de radioimunoensaio (RIA), porém, essa técnica se mostrava ineficiente para o processo de adsorção de alguns antígenos tanto livres quanto ligados. Uma característica dos testes ELISA é a utilização de anticorpos para detectar a presença do antígeno (CROWTHER, 1995).

Diferentes imunoensaaios passaram a ser chamados de ELISA, alguns utilizando enzimas e outros que não necessitavam da separação dos antígenos livres ou ligados. O ELISA se demonstrou extremamente importante para reconhecer e quantificar antígenos e anticorpos em grandes números de amostras. Existem diferentes tipos de superfícies sólidas utilizadas para imunoensaaios, porém o ELISA permanece popular devido a facilidade de execução, reagentes de baixo custo e precisão. Entre as principais vantagens do ELISA podemos citar a rapidez, sensibilidade, simplicidade de execução, adaptabilidade, baixo custo, aceitabilidade, segurança e disponibilidade (CROWTHER, 1995). Porém, existe uma limitação para a técnica, ela não é capaz de demonstrar nenhuma característica bioquímica da molécula, como por exemplo, seu peso molecular ou sua distribuição espacial nos tecidos (AYDIN, 2015; TIGHE et al., 2015; SHAH; MAGHSOUDLOU, 2016).

Os testes ELISA consistem basicamente em uma reação antígeno-anticorpo, seguida por uma etapa onde se utiliza um antígeno ou anticorpo conjugado com uma enzima, um substrato e por último uma substância reveladora (DAVIS; MOON, 1990). Um fator que interfere diretamente na técnica é a especificidade de ligação ou reação cruzada do anticorpo com demais proteínas que não sejam a proteína alvo, uma vez que, o anticorpo é a parte determinante da sensibilidade e especificidade do ensaio, assim, quanto maior sua interação com o antígeno, uma menor fração pode ser detectada pela técnica (CROWTHER, 2001).

Crowther (1995) explica que existem diferentes tipos de ensaios ELISA e que eles dependem de qual reagente está sendo utilizado inicialmente para se fixar na placa e qual reagente será adicionado posteriormente, isso é muito importante para a versatilidade do teste e todas suas adaptações e aplicações. Os testes ELISA podem ser classificados como direto, indireto ou de captura e cada um destes ensaios ainda pode ser modificado para um formato competitivo ou não-competitivo. O formato competitivo pode ser descrito pela introdução de um número desconhecido de antígeno em uma amostra e também de um antígeno de referência que irão competir para se ligar em um número limitado de anticorpos. Todavia, esse ensaio pode ser executado tanto com um anticorpo adsorvido na placa como com um antígeno.

O chamado ELISA indireto é a forma mais utilizada do ensaio para a detecção e

titulação de anticorpos específicos a partir de uma amostra de soro e nesse caso, a especificidade do teste é dada pelo antígeno que está aderido à placa, devendo ser altamente purificado e caracterizado (CROWTHER, 2001).

A quantificação de anticorpos presentes em uma amostra é fornecida através da construção de uma curva padrão. Ou seja, para determinar uma quantidade desconhecida de anticorpos, deve ser feita a comparação da leitura de densidade óptica (DO) obtida de diferentes diluições de aliquotas desconhecidas com a curva padrão. Em um cenário ideal as diluições serão paralelas as diluições feitas para a construção da curva padrão, caso diferente, deve-se diluir ainda mais a amostra (AYDIN, 2015; TIGHE et al., 2015; SHAH; MAGHSOUDLOU, 2016).

Ainda não existe um método padrão de ELISA para a avaliação da presença de anticorpos no soro de ratas tratadas com a molécula formulado de eCG (Padrão internacional PMSG – NZY02), que são submetidas ao protocolo de supervolução, mesmo sendo o ELISA um método robusto e amplamente utilizado em laboratórios para quantificação de anticorpos. A padronização do teste no presente trabalho será muito útil para laboratórios de pesquisa básica e aplicada, assim como laboratórios comerciais.

O objetivo dessa análise é a padronização do teste de imunodiagnóstico ELISA, afim de se realizar uma verificação da ocorrência de correlação entre potencial imunogênico e potencial biológico da molécula, visando a proposição de teste alternativo de potência biológica baseado em teste sorológico, o que dispensaria a colheita de material post-mortem de animais experimentais.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar o formulado de eCG (Padrão internacional PMSG – NZY02) em diferentes concentrações e padronizar o teste de imunodiagnóstico ELISA para a detecção da produção de anticorpos anti-eCG em ratas imaturas submetidas a protocolos de superovulação.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a presença de anticorpos nos soros dos animais tratados com a molécula de eCG em ratas submetidas aos protocolos de superovulação e comparar com o grupo controle;
- Avaliar se há diferença significativa e/ou correlação entre as diferentes concentrações do formulado de eCG (11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL e 26 UI/mL);
- Avaliar a especificidade do teste de ELISA por baixa leitura de absorbância no grupo controle negativo em relação ao soro teste e pela titulação;
- Avaliar o peso ovariano de ratas do grupo tratado e grupo controle.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Aspectos éticos no uso de animais**

O presente estudo foi submetido à Comissão de Ética para o Uso de Animais em Experimentação da Ourofino Saúde Animal Ltda e foi aprovado sob o certificado de número 084/2021 (Anexo I). Todos os procedimentos envolvendo a manipulação e avaliação de animais foram executados pelo Médico Veterinário responsável pela condução do experimento, Osmar Dias Ferraz Junior (CRMV/SP 48038).

### **4.2 Local e período de realização do estudo**

O experimento foi conduzido no Biotério da empresa Ourofino Saúde Animal, localizado no Centro de Pesquisa Veterinária (CPV) na cidade de Guatapar – SP, com início no dia 04 de agosto de 2021 e duração de 28 dias.

### **4.3 Origem e destino dos animais**

Os animais utilizados foram provenientes do fornecedor Anilab, que fica localizado na cidade de Paulínia – SP. Após o término do estudo, os animais foram eutanasiados seguindo as Diretrizes de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e as carcaças autoclavadas e posteriormente enviadas para incineração.

### **4.4 Ambiente e manejo dos animais**

Para o presente estudo foram utilizadas 80 ratas (*Rattus norvegicus*), hgidas, padrão sanitário convencional da linhagem Wistar, com 24 dias de vida, de acordo com a Pharmacopeia Europeia (2013). Foram selecionados somente animais sdios e em bom estado nutricional e sanitário. A diferença de peso entre os animais foi de no máximo 10g.

Durante toda a etapa experimental, as ratas foram mantidas no CPAL (Centro de Pesquisa com Animais de Laboratório), com temperatura controlada de 20 a 26 C e umidade relativa do ar de 30 a 70%, de acordo com a RN 15, de 16 de dezembro de 2013. O controle de temperatura e umidade, bem como das trocas de ar foi realizado a partir de sistema de HVAC (*Heating, Ventilation and Air Conditioning*). As ratas foram abrigadas em sistema IVC (*Intra*

*Ventilated Cages*), dotados de mini-isoladores medindo 316 x 215 x 207 mm, contendo cama de flocos de pinus, respeitando a quantidade de 05 animais por caixa.

O fornecimento de água e ração específica foi *ad libitum* durante o estudo. A iluminação da sala foi como o ciclo circadiano de 12 horas de claro (início às 06h00 min) e 12 horas de escuro (início às 18h00 min), sendo o fotoperíodo controlado por sistema automatizado. Em momentos pré-definidos, os animais foram devidamente contidos para realização da inoculação e demais procedimentos propostos.

#### **4.5 Preparo e diluição das amostras**

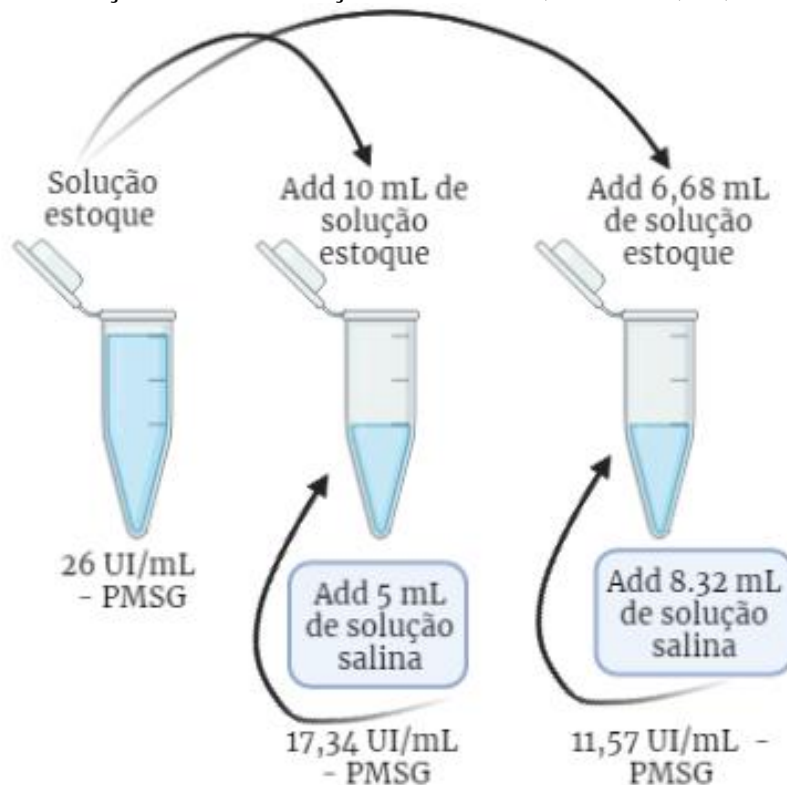
Para a padronização da técnica de ELISA para detecção de anticorpos anti-eCG em ratas optou-se pela utilização de um padrão internacional PMSG de potência biológica conhecida, que é rotineiramente utilizado nos testes de potência para o controle de qualidade e liberação de lotes comerciais do formulado SincroeCG® da Ourofino Saúde Animal.

O padrão internacional utilizado foi uma amostra do produto Padrão PMSG Lote NZY-02, fabricado na região francesa de NRA – Centre Val de Loire, fornecido a Ourofino pelo professor Yves Combarous. O produto possuía data de fabricação de julho/2020 e validade de 10 anos. A formulação tem como forma de apresentação liofilizada e concentração de 2000 UI/mL e foi mantida sob refrigeração na temperatura de 2 a 8°C como recomendação do fabricante.

Como se tratava de um produto liofilizado o primeiro passo foi a ressuspensão do composto liofilizado. Para isso foi utilizada a solução salina (NaCl 0,9%) contendo BSA na concentração de 1 mg/mL. Para o grupo controle foi utilizado a solução diluente (salina com BSA).

As concentrações finais obtidas foram 11,57 UI/mL; 17,34 UI/mL e 26 UI/mL. Para chegar a estas concentrações a partir da eCG liofilizada 2000 UI, se iniciou o processo utilizando 77 mL da solução diluente; desta forma, 2000 UI/77 mL foi obtida a primeira concentração do produto de 26 UI/mL e foi reservado 15 mL desta solução. A partir dos 62 mL restantes foram retirados 10 mL e foi acrescentado mais 5 mL da solução diluente, obtendo assim, 15 mL da segunda concentração 17,34 UI/mL. Por último foram retirados 6,68 mL dos 52 mL restantes da primeira solução e acrescentou-se 8,32 mL de solução diluente, obtendo-se assim 15 mL da terceira concentração 11,57 UI/mL, como demonstrado na figura 1.

Figura 1 - Representação esquemática da diluição do padrão internacional PMSG no ensaio experimental para obtenção das concentrações finais de 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL e 26 UI/mL



Fonte: autoria própria (2022)

#### 4.6 Delineamento experimental

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 4 tratamentos, sendo 3 que receberam a inoculação do formulado avaliado e 1 controle; cada um dos grupos foi ainda dividido em 2 subgrupos, totalizando 8 subgrupos experimentais com 10 animais em cada.

Os animais receberam as concentrações de eCG descritas anteriormente divididas em 6 aplicações de 0,2 mL por via subcutânea nos momentos T0h, T18h, T21h, T24h, T42h e T48h, conforme quadro 1. Metade dos animais de cada um dos grupos (subgrupos 1A, 1C, 1E e 2A), foi eutanasiada 72h após a última inoculação (D5) e compuseram os tratamentos 1A, 1C, 1E e 2A. Previamente à eutanásia foi realizada a pesagem dos animais e colheita de sangue e, posteriormente, necropsia com a retirada e pesagem dos ovários. A outra metade dos animais, compuseram os tratamentos 1B, 1D, 1F e 2B e foi submetida aos mesmos procedimentos de pesagem e colheita de sangue previamente à eutanásia e necropsia com retirada dos ovários, porém, no momento D28.

Quadro 1- Organização dos grupos de ensaio.

Grupo	Subgrupo	Produto	Momento para Colheita de sangue intermediária	Momento para Colheita de sangue final e ovários	Concentração	Nº de aplicações / volume aplicado	Quantidade de animais
1	1A	Padrão PMSG “NZY 02”	-	D5	11,57 UI/mL	6 x 0,2mL	10
	1B		D21	D28	11,57 UI/mL	6 x 0,2mL	10
	1C		-	D5	17,34 UI/mL	6 x 0,2mL	10
	1D		D21	D28	17,34 UI/mL	6 x 0,2mL	10
	1E		-	D5	26 UI/mL	6 x 0,2mL	10
	1F		D21	D28	26 UI/mL	6 x 0,2mL	10
2	2A	Solução salina com 1mg/mL BSA.	-	D5	N.A.	6 x 0,2mL	10
	2B		D21	D28	N.A.	6 x 0,2mL	10

\* UI: Unidades internacionais; NA: Não se aplica; PMSG:

Os produtos foram administrados pela via subcutânea (SC), atrás da cabeça do animal, com a agulha paralela ao corpo, conforme ilustrado na figura 2. Para realizar as inoculações de 0,2 mL, a seringa de 1 mL foi preenchida com 0,6 mL da diluição correspondente, o que foi suficiente para a inoculação de 3 animais por seringa.

Figura 2 - Inoculação subcutânea de padrão internacional PMSG ou solução salina realizada em ratas



Fonte: Acervo Ourofino Saúde Animal.

Para todos os grupos, a inoculação foi de 0,2 mL por animal por aplicação nos tempos T0h, T18h, T21h, T24h, T42h e T48h. Parte dos grupos (1A, 1C, 1E, 2A) permaneceu em repouso por 72 horas após a última inoculação e, no momento D5, foi realizada a pesagem dos animais, anestesia e colheita de sangue, eutanásia e necropsia com a retirada e pesagem dos

ovários. A outra metade dos grupos experimentais (1B, 1D, 1F, 2B) foi submetidas aos mesmos procedimentos de anestesia, colheita de sangue, eutanásia e necropsia com retirada dos ovários, porém, no momento D28. Esses animais ainda foram submetidos à colheita de sangue em D21.

#### **4.7 Protocolo anestésico e analgésico**

Os animais foram submetidos à analgesia por meio do uso de morfina, por via subcutânea, 30 minutos antes do início do procedimento de colheita de sangue. Para tanto, os animais foram anestesiados por via inalatória com Isoflurano (5% para indução e 3% para manutenção).

#### **4.8 Método de eutanásia**

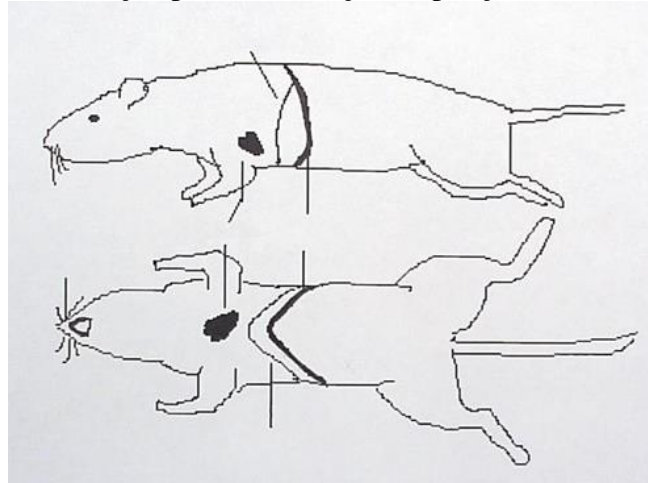
Os animais foram eutanasiados por sobredose de Cetamina (300mg/Kg) e Xilazina (30mg/Kg), pela via intraperitoneal, conforme Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA.

#### **4.9 Colheita de material biológico**

Foram realizadas colheitas de aproximadamente 4 mL de sangue de cada animal antes do procedimento de eutanásia por punção cardíaca. Para a colheita de sangue intermediária o animal foi posicionado em decúbito dorsal sobre a mão de um auxiliar que posicionou o animal com a face voltada ao investigador. Utilizando uma agulha 13x0,45 acoplada a uma seringa de 1 mL, foi possível puncionar a veia jugular de cada uma das ratas.

Para as colheitas finais de sangue as ratas foram posicionadas em decúbito lateral com a face esquerda voltada para o investigador. Em seguida, foi realizada a antissepsia da região com álcool 70% e uma agulha 25x8 acoplada a uma seringa de 5 mL, que foi introduzida entre os espaços intercostais (Figura 3). Em seguida, o animal foi submetido à eutanásia seguindo às diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA.

Figura 3 - Localização do coração para a realização de punção intracardíaca



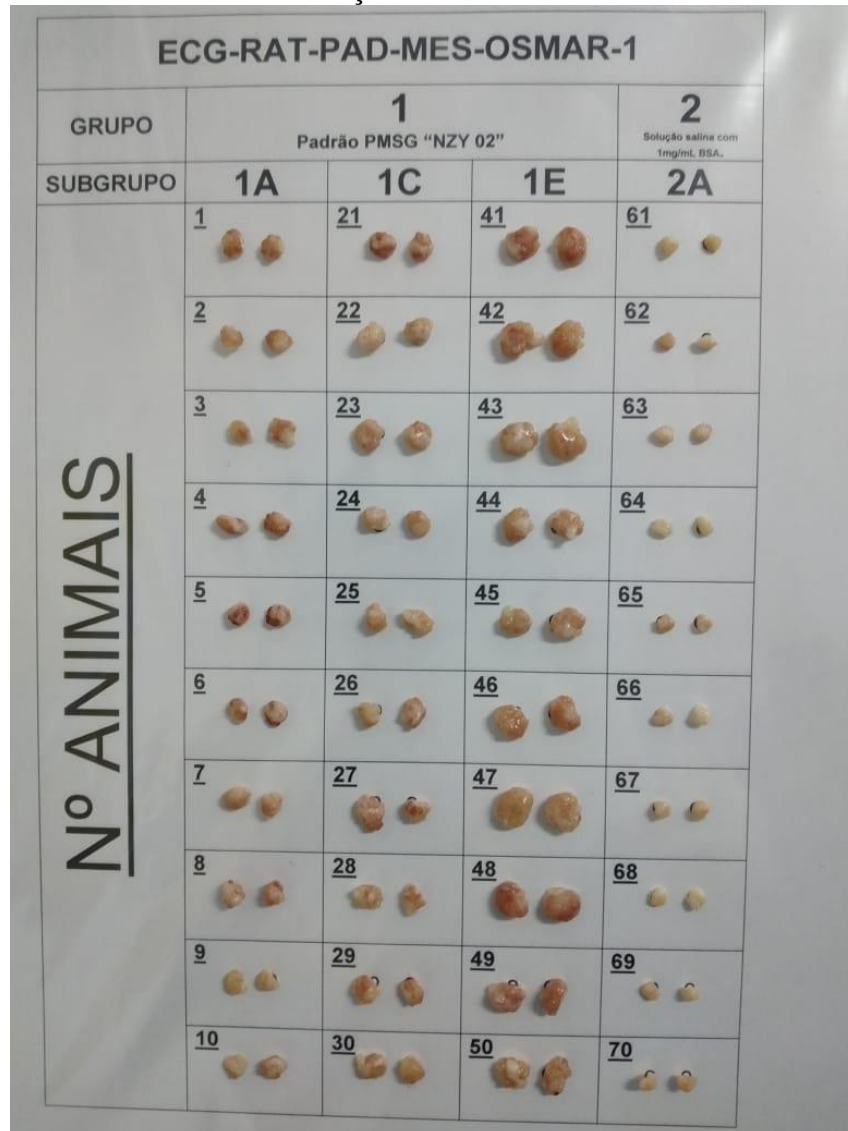
Fonte: Hoff, J. Methods of blood collection in the mouse.

#### 4.10 Processamento e armazenamento das amostras

As amostras de sangue foram mantidas sob refrigeração em temperatura entre 02 e 08 °C, por aproximadamente duas horas, para retração do coágulo. Posteriormente, foram submetidas à centrifugação a 1872 xg por 10 minutos. O soro obtido de cada amostra foi armazenado em microtubos plásticos de 2 mL, em temperatura de -20 °C. O soro foi então encaminhado, sob condições de refrigeração, para o Laboratório de Controle de Qualidade da Ourofino Saúde Animal Ltda, onde foram realizados os testes de padronização ELISA.

Durante a necropsia, os ovários foram cuidadosamente removidos, retirando a gordura e membranas, assim como os ovidutos. Para separar a gordura, os ovários foram rolados em papel filtro, para que a mesma ficasse aderida e então pudesse ser removida, conforme a figura 4. Em seguida, os ovários foram pesados de forma conjunta (ovário direito e ovário esquerdo) em balança de precisão sobre uma placa de Petri.

Figura 4 - Ovários de ratas retirados no momento D5 que foram inoculadas de forma subcutânea com padrão internacional PMSG ou solução salina



Fonte: autoria própria (2021)

As 120 amostras de soro foram divididas em grupos de 10 amostras, de acordo com o grupo experimental informado no quadro 1. A cada grupo foi feito *pool* com as 10 amostras disponíveis de acordo com o momento de colheita de cada grupo (D5, D21 e/ou D28). Todos os *pools* foram testados em quadruplicata por ELISA em todas as diluições partindo da diluição de 1/100 e dividindo na base 2 até a diluição de 1/6400.

A média dos valores de absorbância das amostras negativas adicionada de duas vezes o desvio padrão dessas amostras foi utilizada para determinar o *cut off* (ponto de corte), o desvio padrão - SD (*standard deviation*) que foi utilizado na fórmula garante a segurança do resultado (CROWTHER, 1995). Desta forma, o *cut off* foi determinado como =  $\bar{X}DO + 2x SD$  (95,0% de

confiança), sendo  $\bar{X}DO$  a média da Densidade Óptica e o SD. Todas as amostras que apresentaram uma  $DO_{492nm}$  superior ao *cut off* foram consideradas positivas para a produção de anticorpos anti-eCG.

O teste de potência da gonadotrofina sérica equina corresponde a um modelo de dose-resposta de linhas paralelas, conforme descrito na *Pharmacopeia* Europeia.

Após do registro dos pesos dos ovários planilha excel, calculou-se a Média e CV% dos pesos para cada concentração de cada grupo do estudo. O CV% deve ser preferivelmente inferior a 25%, este valor foi considerado devido ao teste padronizado pela empresa Ourofino Saúde Animal.

#### 4.11 ELISA indireto para diagnóstico sorológico

No primeiro dia foi realizado o *coaching overnight* (sensibilização durante a noite) de microplacas de 96 poços (Nunc Immuno 96 MicroWell™ Plates MaxiSorp™) com 100µL/poço da solução de sensibilização, para esta solução, foi realizada a diluição de 254,9ng do Padrão internacional PMSG NZY-02 em 100mL de solução tampão PBS (pH 7,2).

No segundo dia foram preparadas três soluções principais, a solução de lavagem PBS-T 0,05% (800 mL de solução tampão PBS mais 400 µL de solução Tween 20%), a solução de bloqueio PBS-Leite 5% (80 mL da solução de lavagem PBS-T 0,05% mais 4 g de leite em pó integral) e a solução de diluição PBS-Leite 1% (10 mL da solução de bloqueio PBS-Leite 5% mais 50 mL da solução de lavagem PBS-T 0,05%).

As microplacas que passaram pelo *coaching overnight* foram então lavadas com 250 µL/poço da solução de lavagem por três vezes. Após esse processo elas foram bloqueadas com 200 µL/poço da solução de bloqueio por uma hora em temperatura ambiente e em seguida foi realizada novamente a lavagem com 250 µL/poço da solução de lavagem por três vezes. Foi feito um *pool* com o soro obtido dos animais para cada grupo experimental e em cada diferente momento de coleta (D5, D21 e D28).

As microplacas foram divididas no sentido de linhas verticais em três grupos de 32 poços, um para cada momento de coleta (D5, D21 e D28) e cada um desses grupos em quatro subgrupos também no sentido vertical de oito poços cada um, cada subgrupo representando um grupo experimental de acordo com as concentrações de PMSG que foram inoculadas nas ratas (11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL, 26 UI/mL e Grupo controle que recebeu apenas solução salina), conforme a figura 5:

Figura 5 – Diagrama de distribuição das concentrações de 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL, 26 UI/mL do padrão internacional PMSG e grupo controle nos momentos D5, D21 e D28 em placa de 96 wells

DIAGRAMA PLACA ELISA												
Momento	D5				D21				D28			
Diluição	11,57 UI/mL	17,34 UI/mL	26 UI/mL	Sol. Salina	11,57 UI/mL	17,34 UI/mL	26 UI/mL	Sol. Salina	11,57 UI/mL	17,34 UI/mL	26 UI/mL	Sol. Salina
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Fonte: autoria própria (2022)

Foi colocado em cada poço da placa, excluindo a primeira fileira horizontal de poços, 100 µL de solução de diluição por poço. Na primeira fileira horizontal da placa de acordo com os grupos e subgrupos foram colocados 200 µL da diluição de pools 1%. Foi realizada através de pipetagem a passagem de 100 µL do soro de um poço para o outro no sentido vertical da placa respeitando as divisões feitas anteriormente. Obtendo assim as seguintes de diluições: 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200 e 1/6400 e foram descartados os 100 µL obtidos no penúltimo poço, pois a última fileira horizontal foi considerada o Branco. Essa placa foi incubada em temperatura ambiente por uma hora, após esse período foi realizada a lavagem da placa com a solução de lavagem por três vezes.

O anticorpo conjugado Anti-Rat igG foi diluído em solução de diluição e foi então adicionado na microplaca 100 µL/poço na proporção de 1% (990 µL de solução de diluição PBS-Leite 1% mais 10 µL de pool de soro) e esta novamente incubada em temperatura ambiente por uma hora. Foi realizada novamente a lavagem da placa com 250 µL/poço de solução de lavagem por seis vezes. Foi então adicionado 100 µL/poço de substrato cromógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TMB-Biolegend) e a placa foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz.

A reação foi parada utilizando uma solução stop (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N) 50 µL/poço e em seguida foi feita a leitura das placas em comprimento de ondas 492 nm utilizando uma leitora de ELISA Multiskan EX Thermo.

#### 4.11.1 Padronização do teste

A concentração ótima do anticorpo conjugado (anti-IgG de ratos conjugado com peroxidase produzido em ratos – Sigma) para a padronização do teste foi determinada a partir

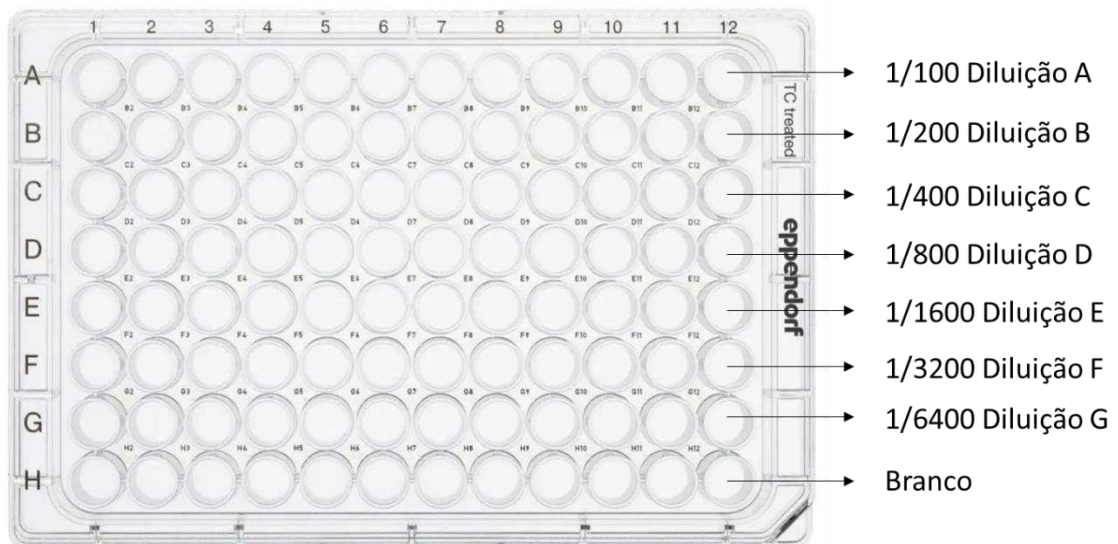
dos testes realizados no laboratório do Controle de Qualidade de Biológicos da Ourofino – CQBio e com base nos estudos de Mantovani (2010).

Inicialmente foi realizada a diluição de 254,9 ng do Padrão internacional PMSG NZY-02 em 100mL de solução tampão PBS (pH 7,2), para a solução de sensibilização. A microplaca com 96 *wells* foi sensibilizada com 100  $\mu$ L/poço da solução no primeiro dia para o coaching overnight (sensibilização durante a noite). A concentração ótima do anticorpo foi determinada por meio de titulação padrão.

Foi feito um pool com o soro obtido dos animais para cada grupo experimental e em cada diferente momento de coleta (D5, D21 e D28). Estes pools de soro foram diluídos em solução de diluição na proporção de 1% (990  $\mu$ L de solução de diluição PBS-Leite 1% mais 10  $\mu$ L de pool de soro). A concentração ótima da diluição do pool de soro foi determinada por meio de titulação padrão.

O soro foi adicionado a partir da diluição 1/100 até 1/6400, iniciando em todos os poços na linha A e sendo diluído na base 2, serialmente até a linha G e mantendo a linha H como Branco, sem a presença do soro, como demonstrado na figura 6:

Figura 6 - Distribuição da diluição de 1/100 até 1/6400 do soro dos animais e grupo controle em placa de 96 *wells*



Fonte: autoria própria (2022)

Foi determinado que, a concentração do anticorpo que apresentou maior interação com as diluições do *pool* de soro foi determinada como a diluição ótima do anticorpo. O ensaio foi realizado para localizar uma diluição "ótima" do conjugado, na qual se observa o branco menor que DO<sub>492nm</sub> 0.1.

#### 4.12 Análise estatística

Os dados foram analisados através do programa IBM SPSS Statistics (Versão. 27.0.1.0). Para a análise da concentração de anticorpos anti-eCG, foram utilizados os procedimentos estatístico: ANOVA, Kruskal-Walls, Kolmogorov e Turkey.

O teste de normalidade (Kolmogorov) foi utilizado, e observou-se que apenas no momento D28, em relação ao peso dos ovários havia distribuição normal, onde foi realizado o teste ANOVA, para os resultados não paramétricos, foi realizado o teste estatístico Kruskal-Walls. Nas análises com distribuição normal, foi realizado o teste de Turkey, que utiliza a análise de variância. Para constatar se há ou não diferença significativa nas amostras, foi realizado também o teste de intervalo de confiança para duas amostras independentes.

Para a descrição dos resultados, foi calculado a média e o desvio padrão dos dados obtidos. Além disso, para o cálculo do peso dos ovários, também foi estimado o coeficiente de variação que foi calculado com a seguinte fórmula em Excel:  $=(D.P./Média) \times 100$ . As probabilidades de  $P \leq 0.05$  foram consideradas como significativas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Padronização do teste ELISA

Para o ensaio inicial, foi feito um *pool* com o soro obtido dos animais para cada grupo experimental do momento de coleta D21. E foi então realizada a diluição desses soros em solução de diluição 1/100. O anticorpo Anti-Rat IgG foi diluído na proporção de 1/5000 em solução de diluição de acordo com a técnica sugerida por Mantovani (2010). Paralelo a isso, foram feitas mais duas placas: uma com o antígeno diluído 1/10000 e outra com o antígeno diluído 1/25000, como demonstrado na tabela 1:

Tabela 1- Valores de absorvância de anticorpos anti-eCG produzidos por ratas sacrificadas no momento D5, que receberam as concentrações de eCG: 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL, 26 UI/mL e controle, com diluições do anticorpo anti eCG de 1/5000, 1/10000 e 1/25000.

Concentração (UI/mL)	1/5000		1/10000		1/25000	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
<b>11,57</b>	3,292572	0,2345562	3,257429	0,4487746	2,839571	0,6109167
<b>17,34</b>	3,375857	0,3223391	3,169714	0,445964	2,663571	0,7001969
<b>26</b>	3,413571	0,2919799	3,126429	0,2653337	2,845	0,5927287
<b>0</b>	1	0,751	0,449	0,363	0,234714	0,160089

Porém, nestas condições não foi possível encontrar a diluição "ótima" do conjugado, onde se observa o branco menor que  $D.O_{450\text{ nm}}$  com correção de 620 nm, como pode ser observado na tabela 1. Por este motivo, foram realizadas modificações experimentais, de acordo com a rotina de testes ELISA do laboratório CQBio. Além disso, de acordo com o fabricante do conjugado antígeno Anti-rat igG, a diluição deve ser de pelo menos 1/50000, então seguiu-se para outra etapa de padronização.

Na segunda etapa, foi realizado um *pool* com o soro obtido dos animais para cada grupo experimental e em cada diferente momento de coleta (D5, D21 e D28). O antígeno Anti-Rat igG foi diluído na proporção de 1/50000. Paralelo a isso foram realizadas mais duas placas uma onde o antígeno foi diluído nas proporções 1/75000 e outra 1/100000 em solução de diluição. O resultado pode ser observado na tabela 2:

Tabela 2 - Ensaio de padronização de ELISA, com os valores de absorbância de anticorpos anti-eCG produzidos por ratas sacrificadas no momento D5, que receberam as concentrações de eCG: 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL, 26 UI/mL e controle, com diluições do anticorpo anti eCG de 1/50000, 1/75000 e 1/100000.

<b>1/100000</b>						
<b>Concentração (UI/mL)</b>	D5		D21		D28	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
<b>11,57</b>	0,032	0,004386	0,347	0,346016	0,334	0,315570
<b>17,34</b>	0,034	0,005507	0,344	0,328391	0,312	0,290778
<b>26</b>	0,028	0,009370	0,38	0,350837	0,33	0,290663
<b>0</b>	0,034	0,005381	0,034	0,006914	0,034	0,006945
<b>1/50000</b>						
<b>Concentração (UI/mL)</b>	D5		D21		D28	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
<b>11,57</b>	0,077	0,007227	0,596	0,554461	0,55	0,535245
<b>17,34</b>	0,076	0,006938	0,573	0,524918	0,5	0,474329
<b>26</b>	0,074	0,011458	0,691	0,624229	0,608	0,566494
<b>0</b>	0,074	0,009268	0,081	0,015638	0,083	0,012556
<b>1/75000</b>						
<b>Concentração (UI/mL)</b>	D5		D21		D28	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
<b>11,57</b>	0,058	0,00650	0,436	0,42644	0,39	0,36831
<b>17,34</b>	0,056	0,00670	0,422	0,41263	0,346	0,33678
<b>26</b>	0,058	0,01294	0,479	0,45388	0,428	0,39543
<b>0</b>	0,057	0,00976	0,065	0,01924	0,064	0,01125

Utilizando essa nova técnica foi possível observar titulação de anticorpos quando se diluiu o conjugado na diluição 1/75000; porém, o destaca-se o resultado obtido na placa com a diluição de 1/100000, que apresenta maior índice de diluição, e dados acima de D.O.<sub>429nm</sub> em 0,2, e por este motivo a diluição de 1/100000 foi selecionada no processo de padronização desta técnica com essa diluição do conjugado.

Depois disso para confirmar os resultados obtidos na tabela 2, foi realizado o mesmo teste em quadruplicata e os resultados foram acima de D.O.<sub>429nm</sub> 0,2 em todas as placas, conforme demonstrado na tabela 3:

Tabela 3 - Ensaio de confirmação da padronização de ELISA, com os valores de absorvância de anticorpos anti-eCG produzidos por ratas, que receberam as concentrações de eCG: 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL, 26 UI/mL e controle, com diluições do anticorpo anti eCG selecionada de 1/100000.

<b>D5 1/100000</b>								
	<b>0 UI/mL</b>		<b>11,57 UI/mL</b>		<b>17,34 UI/mL</b>		<b>26 UI/mL</b>	
<b>Diluição</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>
<b>1/100</b>	0,067	0,003	0,065	0,004	0,06	0,005	0,067	0,01
<b>1/200</b>	0,057	0,004	0,057	0,002	0,048	0,004	0,05	0,004
<b>1/400</b>	0,048	0,004	0,05	0,005	0,047	0,005	0,047	0,003
<b>1/800</b>	0,047	0,002	0,048	0,004	0,046	0,003	0,045	0,004
<b>1/1600</b>	0,044	0,002	0,047	0,003	0,043	0,005	0,043	0,003
<b>1/3200</b>	0,045	0,003	0,048	0,003	0,047	0,002	0,045	0,022
<b>1/6400</b>	0,044	0,003	0,048	0,003	0,047	0,003	0,045	0,004

<b>D21 1/100000</b>								
	<b>0 UI/mL</b>		<b>11,57 UI/mL</b>		<b>17,34 UI/mL</b>		<b>26 UI/mL</b>	
<b>Diluição</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>
<b>1/100</b>	0,082	0,009	1,106	0,074	1,063	0,074	1,155	0,087
<b>1/200</b>	0,064	0,01	0,66	0,039	0,642	0,031	0,739	0,036
<b>1/400</b>	0,051	0,006	0,388	0,022	0,389	0,026	0,467	0,024
<b>1/800</b>	0,048	0,005	0,252	0,011	0,243	0,014	0,291	0,013
<b>1/1600</b>	0,041	0,004	0,151	0,007	0,139	0,004	0,169	0,004
<b>1/3200</b>	0,045	0,004	0,101	0,005	0,098	0,002	0,111	0,002
<b>1/6400</b>	0,044	0,004	0,076	0,002	0,073	0,002	0,078	0,004

<b>D28 1/100000</b>								
	<b>0 UI/mL</b>		<b>11,57 UI/mL</b>		<b>17,34 UI/mL</b>		<b>26 UI/mL</b>	
<b>Diluição</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>
<b>1/100</b>	0,074	0,006	1,004	0,04	0,856	0,072	1,028	0,074
<b>1/200</b>	0,064	0,01	0,602	0,031	0,513	0,031	0,641	0,032
<b>1/400</b>	0,054	0,018	0,366	0,018	0,304	0,016	0,406	0,026
<b>1/800</b>	0,054	0,004	0,23	0,01	0,196	0,008	0,258	0,01
<b>1/1600</b>	0,047	0,004	0,138	0,005	0,144	0,006	0,158	0,007
<b>1/3200</b>	0,049	0,004	0,092	0,004	0,085	0,005	0,106	0,006
<b>1/6400</b>	0,047	0,003	0,072	0,004	0,064	0,005	0,079	0,004

## 5.2 Análise do peso dos animais tratados

Após realizadas as análises da padronização de ELISA, foram analisados os seguintes resultados quanto ao peso dos animais no momento D5, apresentados no gráfico 1.

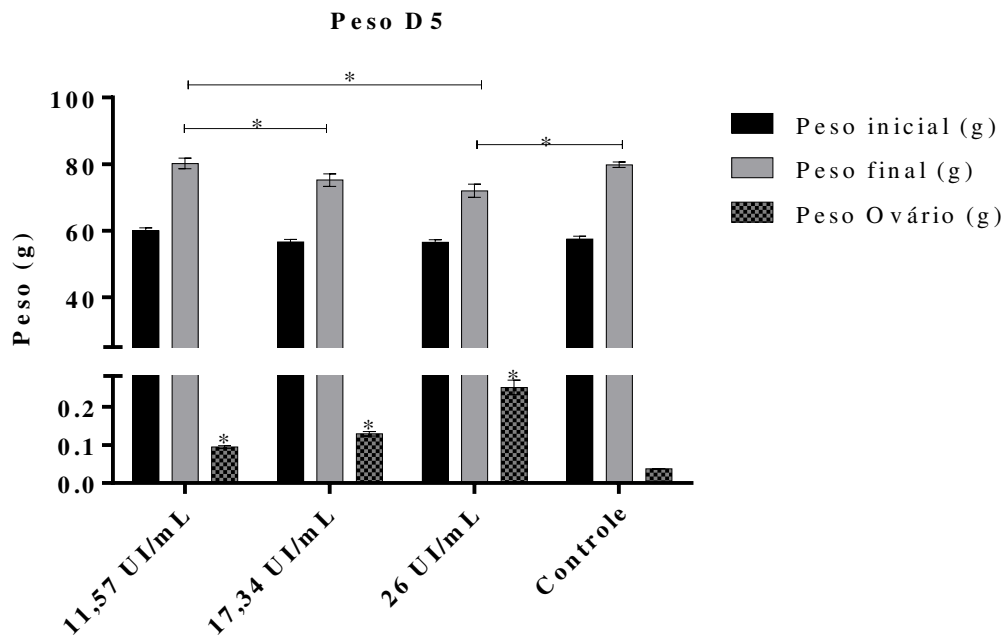


Gráfico 1 - Média e desvio padrão dos peso (g) no momento D5 de 40 ratas heterogêneas inoculadas com padrão internacional PMSG nas concentrações 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL, 26 UI/mL e grupo controle, que foram medidos no início do estudo antes da inoculação (Peso Inicial), e ao final do estudo antes da eutanásia (Peso Final e Peso dos Ovários). \* $p \leq 0.05$ .

Houve aumento de peso corporal dos animais em todos os grupos, o que é esperado, visto que os animais apresentam rápido ganho de peso na idade na qual se encontravam. Segundo dados da literatura, ratos fêmeas da espécie *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar, apresentam aproximadamente 60 gramas com 24 dias e 80 gramas com 29 dias (DE FARIA; STABILILE, 2007). Os resultados demonstram que os animais obtiveram ganho de peso de acordo com os dados da literatura.

É importante ressaltar que os animais que receberam as doses 17,34 UI/mL e 26 UI/mL apresentaram redução no peso final, quando comparado ao grupo controle, mesmo com o aumento do peso do ovário. Não foi possível localizar dados na literatura que confirmem e/ou indiquem por qual motivo os animais apresentam peso menor quando comparado ao grupo controle e em relação aos outros grupos quando tratados com eCG.

Além disso, há uma diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao peso dos ovários entre os grupos controle, e inoculados com as concentrações 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL e 26 UI/mL. Há ainda, diminuição significativa quando comparados os grupos de concentração 11,57 UI/mL (0,095 g) e 17,34 UI/mL (0,129 g), há uma redução de 37% no peso dos animais. Esse resultado também é observado quando comparados os grupos 17,34 UI/mL (0,129 g) e 26 UI/mL (0,250 g), em que há uma redução de 49% do peso.

Esse dado indica que pode haver uma relação com as alterações morfológicas frente

ao tratamento com eCG sérico. Este aumento da massa ovariana observado no presente estudo é corroborada pelos dados obtidos por Cole e Harte (1930). Um estudo publicado por Jurczak e colaboradores (2016) observaram em seu trabalho que há um aumento no número de corpos lúteos e folículos; além disso, Rizzo e colaboradores (2009) discutiram que o crescimento folicular induzido por eCG inclui o maior recrutamento de pequenos folículos e aumento da taxa de crescimento, e aumento de peso dos ovários (MELLO et al., 2014).

Nos grupos experimentais 1B, 1D, 1F e 2B também foram analisados os pesos inicial e final dos animais e peso dos ovários. Após as análises, foram obtidos os seguintes resultados quanto ao peso dos animais no momento D28 (gráfico 2):

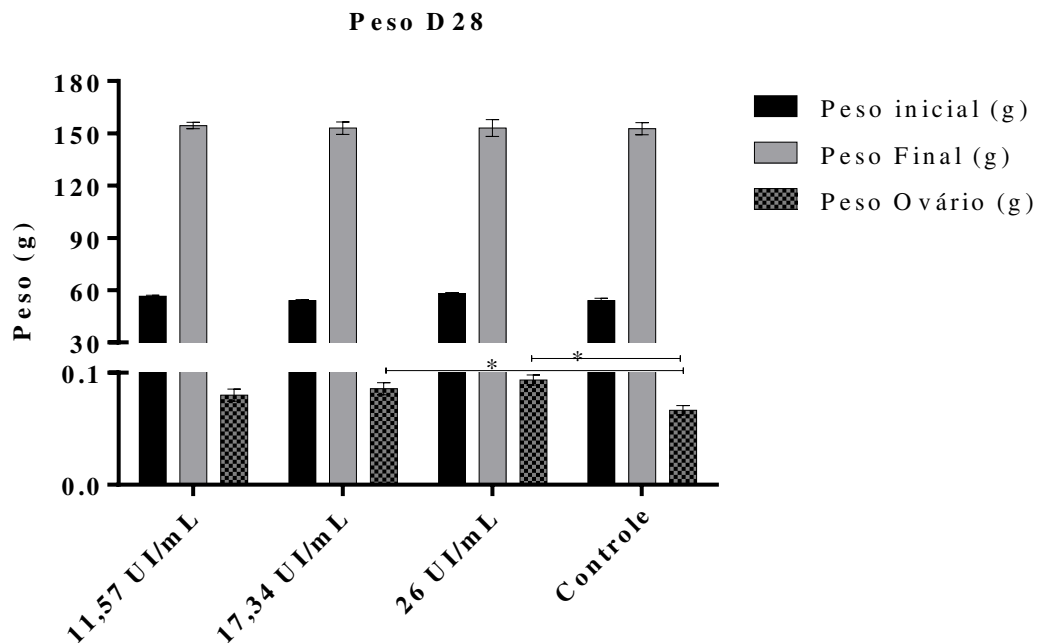


Gráfico 2 - Média e desvio padrão dos peso (g) no momento D28 de 40 ratas heterogêneas inoculadas com padrão internacional PMSG nas concentrações 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL, 26 UI/mL e Controle, que foram medidos no início do estudo antes da inoculação (Peso Inicial), e ao final do estudo antes da eutanásia (Peso Final e Peso dos Ovários). \* $p \leq 0.05$ .

Novamente, observa-se o aumento do peso dos animais quando comparado os pesos inicial e final, mas diferente do apresentado no gráfico 1, não há diferença significativa no peso final dos animais quando comparados ao grupo controle. Isso pode estar associado com o tempo de tratamento, que pode levar ao tempo estimado para a resposta imunológica do animal, discutido por Swanson e colaboradores (1996).

Existe o aumento do peso dos ovários nos grupos 17,34 UI/mL e 26 UI/mL, quando comparados ao grupo controle, e esses dados são corroborados por Cole e Harte (1930), Jurczak e colaboradores (2016) e Rizzo e colaboradores (2009), que indicam que o aumento do número

de corpos lúteos, folículos e crescimento folicular, levam ao aumento de massa ovariana.

Para ser possível comparar e condensar as informações discutidas anteriormente, o pesos dos ovários nos momentos D5 e D28, para as diferentes doses, foi realizada uma nova plotagem dos dados, com o peso inicial e peso final dos ovários, que pode ser observado no gráfico 3:

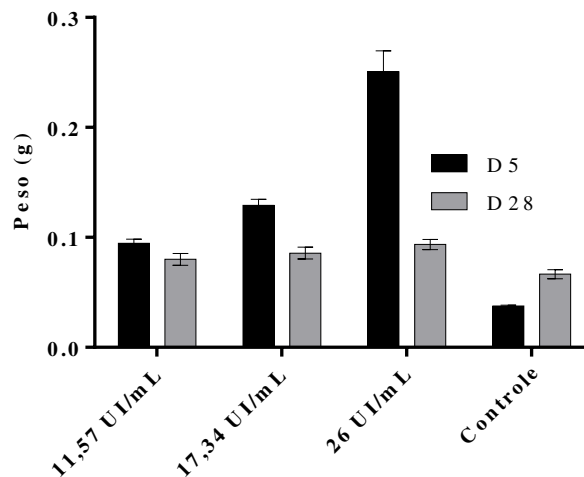


Gráfico 3 - Média e desvio padrão dos pesos (g) dos ovários nos momentos D5 e D28 de 80 ratas heterogêneas inoculadas com padrão internacional PMSG nas concentrações 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL, 26 UI/mL e Controle.

O crescimento folicular é uma desenvolvido de forma natural na fisiologia ovariana, em que é observado de forma contínua e ininterrupta durante todas as fases do ciclo estral. As ratas apresentam durante o seu ciclo estral, que dura 4 dias, a produção média de 7 a 10 oócitos, e quando há a a estimulação de um hormônio exógeno, pode haver aumento na ovulação do animal (KOSTYK et al., 1978) e aumento na incidência de oócitos (LEHTONEN; KANKONDI, 1987). Além disso, a longa meia-vida do eCG está associada com a produção de estrogênio em quantidade e período maior de tempo (WALTON; ARMSTRONG, 1981).

No gráfico 3, é possível observar que o grupo controle D28 (gráfico 2), já possui um crescimento elevado, e os grupos inoculados com as diferentes doses apresentam uma queda no peso do ovário quando comparado ao grupo D5 (gráfico 1). Além disso, devemos levar em conta a ação endógena dos hormônios das ratas, que já estão em período de puberdade (COMBARNOUS et al., 2019). Ou seja, por este motivo, não é possível relacionar o tratamento com o peso dos ovários no momento D28.

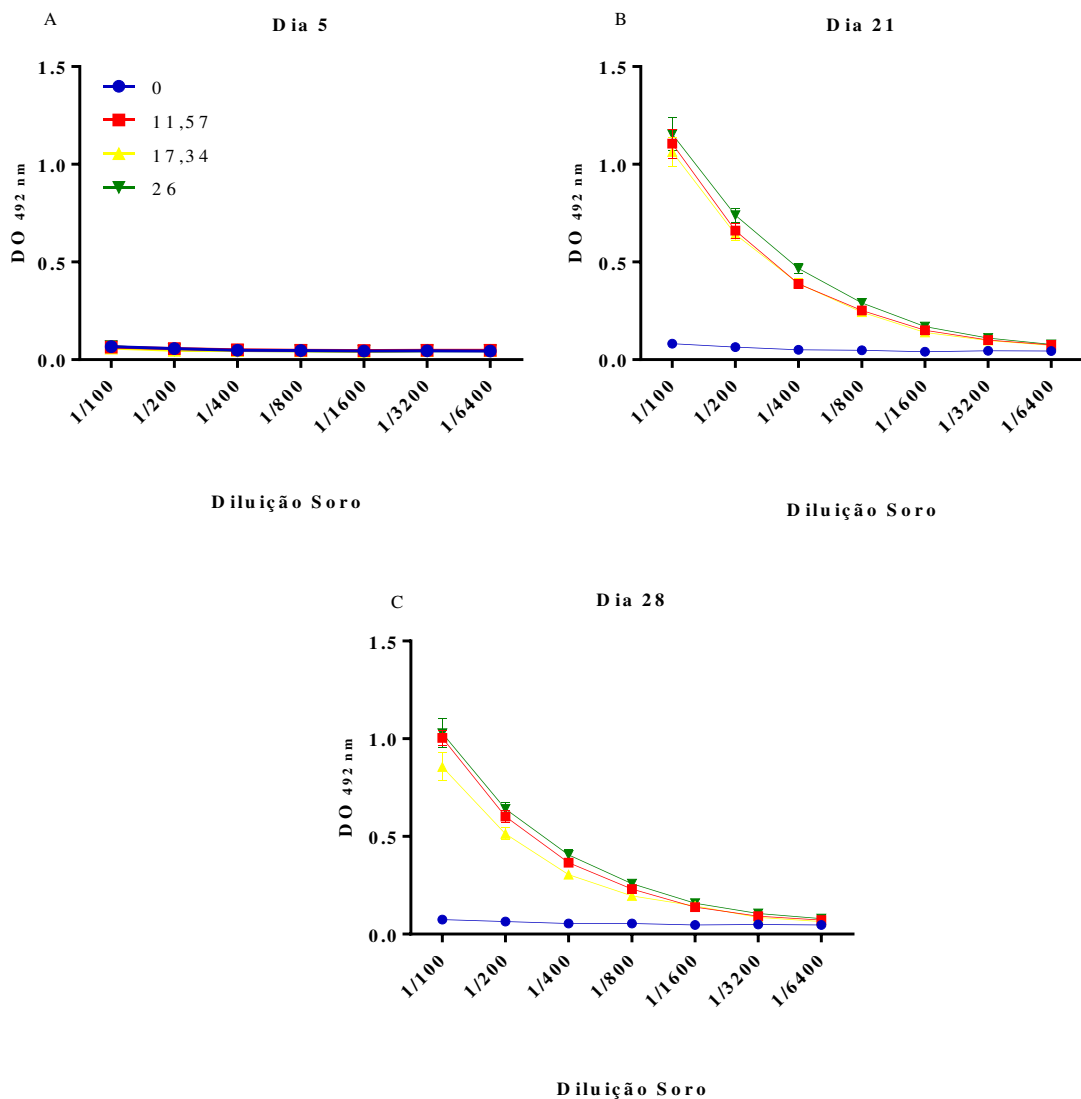


Gráfico 4 - Valores de absorbância de anticorpos anti-eCG produzidos por ratas que receberam as concentrações de eCG: Controle (azul), 11,57 UI/mL (vermelho), 17,34 UI/mL (amarelo) e 26 UI/mL (verde), com diluições variadas de 1/100 – 1/6400 e grupo controle. Amostras de sangue coletadas em D5 (A), D21 (B) e D28 (C).

A baixa concentração de anticorpos anti-eCG no momento D5 (gráfico 1) pode se dar ao fato do animal ser estimulado durante 48h (T0h, T18h, T21h, T24h, T42h e T48h), e com isso, apresentado um elevado grau de ovulação, que pode estar associado com a redução de eCG sérico disponível nos animais, (RIZZO et al., 2009). Porém, não foi mensurado nesse trabalho a quantidade de eCG sérico disponível. Outra teoria e a mais aceita é que essa falta de resposta no momento D5 esteja diretamente ligado a resposta imune das ratas, isso significa que não houve tempo suficiente para tenha gerado uma resposta imunológica, como já foi discutido por Swanson e colaboradores (1996).

Após as análises dos pesos dos animais, foi realizado o cálculo do coeficiente de variação (CV%) para o peso dos ovários nas diferentes doses para os momentos D5 (subgrupos 1A, 1C, 1E, 2A) e D28 (subgrupos 1B, 1D, 1F e 2B). Foi realizado o teste de potência para avaliar a atividade biológica da molécula eCG, e assim inferir se há diferença no peso dos animais quando tratados ou não com eCG. O coeficiente de variação é uma medida que expressa a variação dos dados em relação à média e desvio padrão, apresentados nas tabelas 4 e 5:

Tabela 4 - Cálculo do coeficiente de variação e pesagem do grupo D5.

Produto	Subgrupo	Concentração	Média Peso dos Ovários (g)	D.P. Peso dos Ovários (g)	CV% Peso dos Ovários (g)
<b>Padrão PMSG “NZY 02”</b>	1A	11,57	0,095	0,012	0,012
	1C	17,34	0,129	0,018	13,84
	1E	26	0,251	0,061	24,27
<b>Sol. Salina</b>	2A	NA	0,038	0,002	6,44

Tabela 5 - Cálculo do coeficiente de variação e pesagem do grupo D28.

Produto	Subgrupo	Concentração	Média Peso dos Ovários (g)	D.P. Peso dos Ovários (g)	CV% Peso dos Ovários (g)
<b>Padrão PMSG “NZY 02”</b>	1B	11,57	0,08	0,015	19,03
	1D	17,34	0,086	0,017	19,7
	1F	26	0,094	0,014	15,24
<b>Sol. Salina</b>	2B	NA	0,067	0,013	20

O coeficiente de variação (CV%) para as diferentes concentrações de Padrão PMSG variou entre os seguintes valores no momento D5: Concentração 11,57 UI/mL: 12,55; 17,34 UI/mL: 13,84; 26 UI/mL: 24,27 e Controle: 6,44. Já para o momento D28, o resultado obtido foi: 11,57 UI/mL: 19,03; 17,34 UI/mL 19,70; 26 UI/mL: 15,24 e Controle: 20,00.

Nota-se que no momento D5, o grupo controle apresenta metade do valor de CV% quando comparado aos grupos 11,57 UI/mL e 17,34 UI/mL, e esse valor dobra no grupo 26 UI/mL. Já no momento D28, não é observada essa diferença significativa entre os grupos, e apenas o grupo da concentração de 26 UI/mL, apresenta redução. Esse dado novamente corrobora com o fato de que há ação endógenas dos hormônios sexuais nas ratas que atingiram a puberdade. Esse fato é nítido quando se compara os pesos dos ovários do grupo controle nos momentos D5 e D28, pois, mesmo sem receber nenhuma dose do hormônio, no momento D28

existe crescimento ovariano nas ratas.

### **5.3 Análise do teste ELISA padronizado**

Após a padronização do teste de ELISA, foi realizada a análise de absorvância de anticorpos anti-eCG produzidos por ratas nos momentos D5, D21 e D28 nas diluições de 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 e 1/1600. Nas tabelas de 6, 7 e 8, estão plotados os dados das comparações múltiplas nos momentos D5, D21 e D28. Na tabela 9 foi realizada a comparação múltipla entre os grupos D21 e D28, em que há o cálculo da diferença média entre as amostras, além do intervalo de confiança para duas amostras independentes, importantes para analisar se há diferença significativa entre as amostras. Por fim, no gráfico 5, todos os dados foram plotados para demonstrar os achados mais importantes das análises.

Tabela 6 – Comparações múltiplas do momento D5. Valores de absorbância (proporcional a quantidade de anticorpos anti-eCG) nas diferentes concentrações: controle, 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL e 26 UI/mL.

<b>Comparações Múltiplas - Momento D5</b>					
<b>Variável</b>	<b>(I) Trat.</b>	<b>(J) Trat.</b>	<b>Dif. média (I-J)</b>	<b>95% CI dif.</b>	<b>Sig.?</b>
<b>TIT100D5</b>	0 UI/mL	11,57 UI/mL	0,002	-0,07543 a 0,07943	Não
	0 UI/mL	17,34 UI/mL	0,007	-0,07043 a 0,08443	Não
	0 UI/mL	26 UI/mL	0	-0,07743 a 0,07743	Não
	11,57 UI/mL	17,34 UI/mL	0,005	-0,07243 a 0,08243	Não
	11,57 UI/mL	26 UI/mL	-0,002	-0,07943 a 0,07543	Não
	17,34 UI/mL	26 UI/mL	-0,007	-0,08443 a 0,07043	Não
<b>TIT200D5</b>	0 UI/mL	11,57 UI/mL	0	-0,07743 a 0,07743	Não
	0 UI/mL	17,34 UI/mL	0,009	-0,06843 a 0,08643	Não
	0 UI/mL	26 UI/mL	0,007	-0,07043 a 0,08443	Não
	11,57 UI/mL	17,34 UI/mL	0,009	-0,06843 a 0,08643	Não
	11,57 UI/mL	26 UI/mL	0,007	-0,07043 a 0,08443	Não
	17,34 UI/mL	26 UI/mL	-0,002	-0,07943 a 0,07543	Não
<b>TIT400D5</b>	0 UI/mL	11,57 UI/mL	-0,002	-0,07943 a 0,07543	Não
	0 UI/mL	17,34 UI/mL	0,001	-0,07643 a 0,07843	Não
	0 UI/mL	26 UI/mL	0,001	-0,07643 a 0,07843	Não
	11,57 UI/mL	17,34 UI/mL	0,003	-0,07443 a 0,08043	Não
	11,57 UI/mL	26 UI/mL	0,003	-0,07443 a 0,08043	Não
	17,34 UI/mL	26 UI/mL	0	-0,07743 a 0,07743	Não
<b>TIT800D5</b>	0 UI/mL	11,57 UI/mL	-0,001	-0,07843 a 0,07643	Não
	0 UI/mL	17,34 UI/mL	0,001	-0,07643 a 0,07843	Não
	0 UI/mL	26 UI/mL	0,002	-0,07543 a 0,07943	Não
	11,57 UI/mL	17,34 UI/mL	0,002	-0,07543 a 0,07943	Não
	11,57 UI/mL	26 UI/mL	0,003	-0,07443 a 0,08043	Não
	17,34 UI/mL	26 UI/mL	0,001	-0,07643 a 0,07843	Não
<b>TIT1600D5</b>	0 UI/mL	11,57 UI/mL	-0,003	-0,08043 a 0,07443	Não
	0 UI/mL	17,34 UI/mL	0,001	-0,07643 a 0,07843	Não
	0 UI/mL	26 UI/mL	0,001	-0,07643 a 0,07843	Não
	11,57 UI/mL	17,34 UI/mL	0,004	-0,07343 a 0,08143	Não
	11,57 UI/mL	26 UI/mL	0,004	-0,07343 a 0,08143	Não
	17,34 UI/mL	26 UI/mL	0	-0,07743 a 0,07743	Não

Tabela 7 – Comparações múltiplas do momento D21. Valores de absorbância (proporcional a quantidade de anticorpos anti-eCG) nas diferentes concentrações: controle, 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL e 26 UI/mL.

<b>Comparações Múltiplas - Momento D21</b>					
<b>Variável</b>	<b>(I) Trat.</b>	<b>(J) Trat.</b>	<b>Dif. média (I-J)</b>	<b>95% CI dif.</b>	<b>Sig.?</b>
<b>TIT100D21</b>	0 UI/mL	11,57 UI/mL	-1,024	-1,101 a -0,9466	Sim
	0 UI/mL	17,34 UI/mL	-0,981	-1,058 a -0,9036	Sim
	0 UI/mL	26 UI/mL	-1,073	-1,150 a -0,9956	Sim
	11,57 UI/mL	17,34 UI/mL	0,043	-0,03443 a 0,120	Não
	11,57 UI/mL	26 UI/mL	-0,049	-0,1264 a 0,0284	Não
	17,34 UI/mL	26 UI/mL	-0,092	-0,1694 a -0,0145	Sim
<b>TIT200D21</b>	0 UI/mL	11,57 UI/mL	-0,596	-0,6734 a -0,5186	Sim
	0 UI/mL	17,34 UI/mL	-0,578	-0,6554 a -0,5006	Sim
	0 UI/mL	26 UI/mL	-0,675	-0,7524 a -0,5976	Sim
	11,57 UI/mL	17,34 UI/mL	0,018	-0,05943 a 0,095	Não
	11,57 UI/mL	26 UI/mL	-0,079	-0,1564 a -0,0015	Sim
	17,34 UI/mL	26 UI/mL	-0,097	-0,1744 a -0,0195	Sim
<b>TIT400D21</b>	0 UI/mL	11,57 UI/mL	-0,337	-0,4144 a -0,2596	Sim
	0 UI/mL	17,34 UI/mL	-0,338	-0,4154 a -0,2606	Sim
	0 UI/mL	26 UI/mL	-0,416	-0,4934 a -0,3386	Sim
	11,57 UI/mL	17,34 UI/mL	-0,001	-0,0784 a 0,0764	Não
	11,57 UI/mL	26 UI/mL	-0,079	-0,156 a -0,00157	Sim
	17,34 UI/mL	26 UI/mL	-0,078	-0,1554 a -0,0005	Sim
<b>TIT800D21</b>	0 UI/mL	11,57 UI/mL	-0,204	-0,2814 a -0,1266	Sim
	0 UI/mL	17,34 UI/mL	-0,195	-0,2724 a -0,1176	Sim
	0 UI/mL	26 UI/mL	-0,243	-0,3204 a -0,1656	Sim
	11,57 UI/mL	17,34 UI/mL	0,009	-0,0684 a 0,0864	Não
	11,57 UI/mL	26 UI/mL	-0,039	-0,1164 a 0,0384	Não
	17,34 UI/mL	26 UI/mL	-0,048	-0,1254 a 0,0294	Não
<b>TIT1600D21</b>	0 UI/mL	11,57 UI/mL	-0,11	-0,1874 a -0,0325	Sim
	0 UI/mL	17,34 UI/mL	-0,098	-0,1754 a -0,0205	Sim
	0 UI/mL	26 UI/mL	-0,128	-0,2054 a -0,0505	Sim
	11,57 UI/mL	17,34 UI/mL	0,012	-0,0654 a 0,0894	Não
	11,57 UI/mL	26 UI/mL	-0,018	-0,0954 a 0,0594	Não
	17,34 UI/mL	26 UI/mL	-0,03	-0,1074 a 0,0474	Não

Tabela 8 – Comparações múltiplas do momento D21. Valores de absorbância (proporcional a quantidade de anticorpos anti-eCG) nas diferentes concentrações: controle, 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL e 26 UI/mL.

<b>Comparações Múltiplas - Momento D28</b>					
<b>Variável</b>	<b>(I) Trat.</b>	<b>(J) Trat.</b>	<b>Dif. média (I-J)</b>	<b>95% CI dif.</b>	<b>Sig.?</b>
<b>TIT100D28</b>	0 UI/mL	11,57 UI/mL	-0,93	-1,007 a -0,8526	Sim
	0 UI/mL	17,34 UI/mL	-0,782	-0,8594 a -0,7046	Sim
	0 UI/mL	26 UI/mL	-0,954	-1,031 a -0,8766	Sim
	11,57 UI/mL	17,34 UI/mL	0,148	0,07057 a 0,2254	Sim
	11,57 UI/mL	26 UI/mL	-0,024	-0,1014 a 0,05343	Não
	17,34 UI/mL	26 UI/mL	-0,172	-0,2494 a -0,09457	Sim
<b>TIT200D28</b>	0 UI/mL	11,57 UI/mL	-0,543	-0,6204 a -0,4656	Sim
	0 UI/mL	17,34 UI/mL	-0,454	-0,5314 a -0,3766	Sim
	0 UI/mL	26 UI/mL	-0,582	-0,6594 a -0,5046	Sim
	11,57 UI/mL	17,34 UI/mL	0,089	0,01157 a 0,1664	Sim
	11,57 UI/mL	26 UI/mL	-0,039	-0,1164 a 0,03843	Não
	17,34 UI/mL	26 UI/mL	-0,128	-0,2054 a -0,05057	Sim
<b>TIT400D28</b>	0 UI/mL	11,57 UI/mL	-0,312	-0,3894 a -0,2346	Sim
	0 UI/mL	17,34 UI/mL	-0,25	-0,3274 a -0,1726	Sim
	0 UI/mL	26 UI/mL	-0,352	-0,4294 a -0,2746	Sim
	11,57 UI/mL	17,34 UI/mL	0,062	-0,01543 a 0,1394	Não
	11,57 UI/mL	26 UI/mL	-0,04	-0,1174 a 0,03743	Não
	17,34 UI/mL	26 UI/mL	-0,102	-0,1794 a -0,02457	Sim
<b>TIT800D28</b>	0 UI/mL	11,57 UI/mL	-0,176	-0,2534 a -0,09857	Sim
	0 UI/mL	17,34 UI/mL	-0,142	-0,2194 a -0,06457	Sim
	0 UI/mL	26 UI/mL	-0,204	-0,2814 a -0,1266	Sim
	11,57 UI/mL	17,34 UI/mL	0,034	-0,04343 a 0,1114	Não
	11,57 UI/mL	26 UI/mL	-0,028	-0,1054 a 0,04943	Não
	17,34 UI/mL	26 UI/mL	-0,062	-0,1394 a 0,01543	Não
<b>TIT1600D28</b>	0 UI/mL	11,57 UI/mL	-0,091	-0,1684 a -0,01357	Sim
	0 UI/mL	17,34 UI/mL	-0,097	-0,1744 a -0,01957	Sim
	0 UI/mL	26 UI/mL	-0,111	-0,1884 a -0,03357	Sim
	11,57 UI/mL	17,34 UI/mL	-0,006	-0,08343 a 0,07143	Não
	11,57 UI/mL	26 UI/mL	-0,02	-0,09743 a 0,05743	Não
	17,34 UI/mL	26 UI/mL	-0,014	-0,09143 a 0,06343	Não

Tabela 9 – Comparações múltiplas dos momentos D21 e D28. Valores de absorbância (proporcional a quantidade de anticorpos anti-eCG) nas diferentes concentrações: controle, 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL e 26 UI/mL.

<b>Comparações Múltiplas - Momentos D21 e D28</b>					
<b>Variável</b>	<b>(I) D21 Conc</b>	<b>(J) D28 Conc</b>	<b>Dif. média (I-J)</b>	<b>95% CI dif.</b>	<b>Sig.?</b>
<b>Concentração 0 UI/mL</b>	1:100	1:100	0,008	-0,1018 to 0,1178	Não
	1:200	1:200	0,005	-0,1048 to 0,1148	Não
	1:400	1:400	-0,003	-0,1128 to 0,1068	Não
	1:800	1:800	-0,006	-0,1158 to 0,1038	Não
	1:1600	1:1600	-0,006	-0,1158 to 0,1038	Não
<b>Variável</b>	<b>(I) D21 Conc</b>	<b>(J) D28 Conc</b>	<b>Dif. média (I-J)</b>	<b>95% CI dif.</b>	<b>Sig.?</b>
<b>Concentração 11,57 UI/mL</b>	1:100	1:100	0,102	-0,007773 to 0,2118	Não
	1:200	1:200	0,058	-0,05177 to 0,1678	Não
	1:400	1:400	0,022	-0,08777 to 0,1318	Não
	1:800	1:800	0,022	-0,08777 to 0,1318	Não
	1:1600	1:1600	0,013	-0,09677 to 0,1228	Não
<b>Variável</b>	<b>(I) D21 Conc</b>	<b>(J) D28 Conc</b>	<b>Dif. média (I-J)</b>	<b>95% CI dif.</b>	<b>Sig.?</b>
<b>Concentração 17,34 UI/mL</b>	1:100	1:100	0,207	0,09723 to 0,3168	Sim
	1:200	1:200	0,129	0,01923 to 0,2388	Sim
	1:400	1:400	0,085	-0,02477 to 0,1948	Não
	1:800	1:800	0,047	-0,06277 to 0,1568	Não
	1:1600	1:1600	-0,005	-0,1148 to 0,1048	Não
<b>Variável</b>	<b>(I) D21 Conc</b>	<b>(J) D28 Conc</b>	<b>Dif. média (I-J)</b>	<b>95% CI dif.</b>	<b>Sig.?</b>
<b>Concentração 26 UI/mL</b>	1:100	1:100	0,127	0,01723 to 0,2368	Sim
	1:200	1:200	0,098	-0,01177 to 0,2078	Não
	1:400	1:400	0,061	-0,04877 to 0,1708	Não
	1:800	1:800	0,033	-0,07677 to 0,1428	Não
	1:1600	1:1600	0,011	-0,09877 to 0,1208	Não

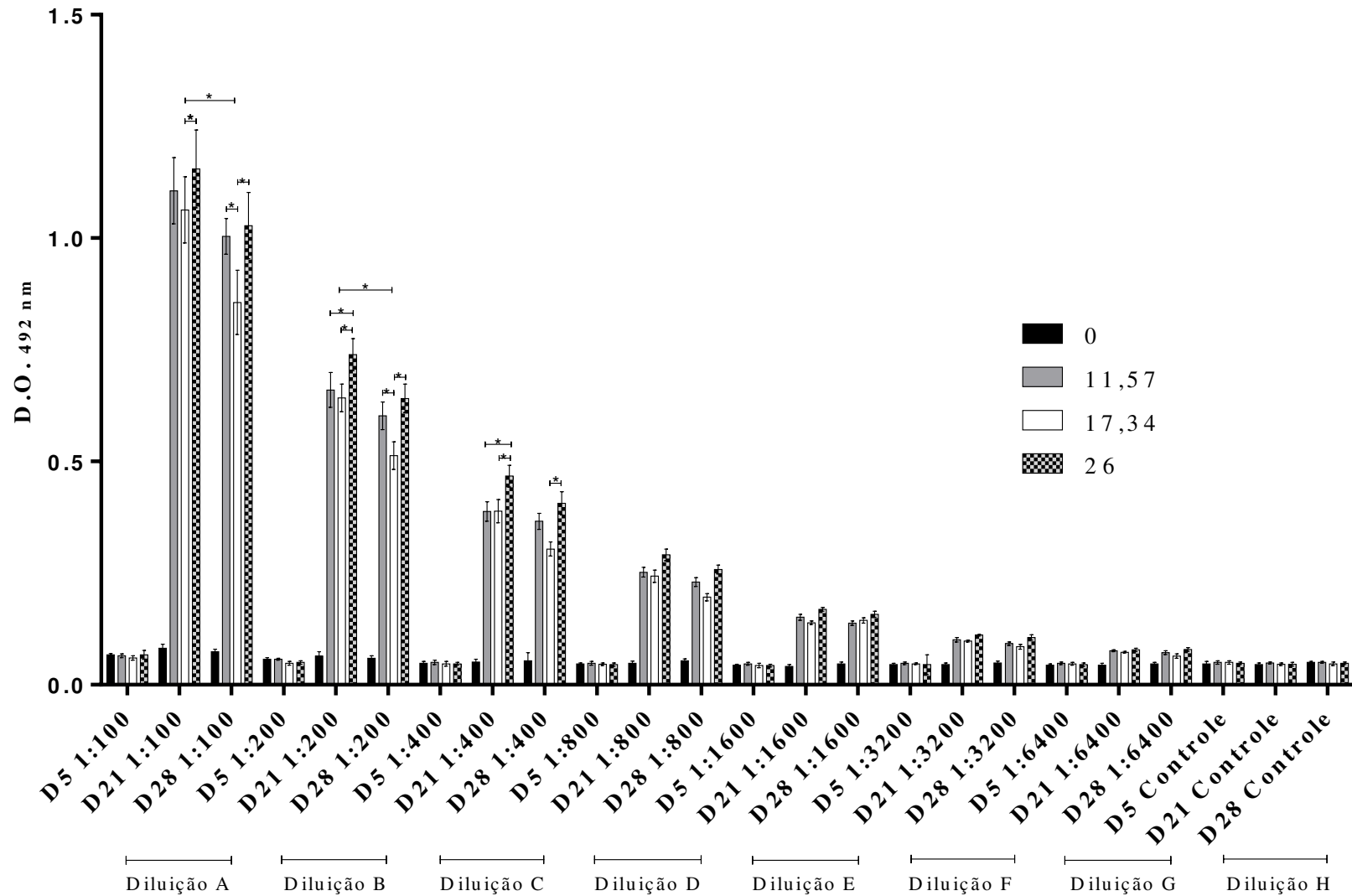


Gráfico 5 - Momento D5, D21 e D28. Valores de absorbância (proporcional a quantidade de anticorpos anti-eCG) nas diferentes concentrações: controle, 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL e 26 UI/mL. As amostras de sangue final e ovários foram coletadas dos animais nos momentos D5, D21 e D28. \* $p \leq 0,05$ .

É possível observar, nos gráficos 4 e 5, no ensaio realizado no momento D5 de coleta, os animais não apresentam alteração nos valores de absorvância quando comparados aos outros momentos.

No gráfico 5, nos momentos D21 e D28, pode-se observar a diferença entre as diluições do soro, sendo entre 1/100 a 1/400 os resultados apresentam diferenças significativas, e que ao aumentar a diluição, há a diminuição na expressão da molécula nos momentos D5, D21 e D28. Há também uma tendência de queda da absorvância quando compara-se os momentos D21 e D28, sendo o momento D21, o que apresenta maior absorvância, refletindo na maior quantidade de anticorpos anti-eCG presente no soro. Quanto às outras concentrações, é possível observar um aumento significativo na expressão, sendo a concentração 26 UI/mL significativamente maior ( $p \leq 0.05$ ) quando comparada principalmente à dose 17,34 UI/mL (GONZALEZ et al., 1994).

Outro dado importante é que existe diferença significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre a concentração (gráfico 4) de 17,34 UI/mL entre os momentos D21 e D28, nas diluições 1:100 e 1:200, e uma tendência de queda nas diluições 1:400 e 1:800. Esse resultado reforça a ideia de que há uma queda nas quantidades de anticorpos anti-eCG do momento D21 para o momento D28. Há relatos que indicam também que existe a possibilidade da molécula de eCG comercial possuir substâncias contaminantes, como discutido por Lea & Bolton (1991). Porém, com os procedimentos de purificação atuais da molécula, torna-se bem pouco provável que tenha alguma relação.

Esse achado não é amplamente discutido na literatura, porém, um trabalho publicado em 1978 por Kostyk e colaboradores, observou a influência de diferentes doses de PMSG na resposta ovulatória de ratas imaturas, 24, 48 e 72 horas após a injeção de PMSG. É possível observar no trabalho, que após 72 horas, todos os grupos (exceto o grupo controle), apresentam duas ou mais ovulações. A quantidade de PMSG em cada grupo e número de animais ovulando foi: 0 IU PMSG (0 ovulações em 8 animais total), 3 IU PMSG (9 ovulações em 12 animais total), 15 IU PMSG (4 ovulações em 12 animais total), 30 IU PMSG (6 ovulações em 12 animais total) e 60 IU PMSG (5 ovulações em 12 animais total). Os autores discutem que esse resultado pode estar relacionado com o grande estímulo de ovulação entre 24h e 48h, e subsequente decaimento na ovulação em 72h. Como não há no experimento com uma dose menor, próxima ao 3 UI, não é possível concluir que seja o caso observado por Kostyk, mas existe uma tendência de diminuição, de acordo com doses maiores.

É possível observar essa afirmação quando há a plotagem no gráfico 6, em que se apresenta a média e desvio padrão das amostras nos momentos D5, D21 e D28, nas concentrações 0 UI/mL (controle), 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL e 26 UI/mL:

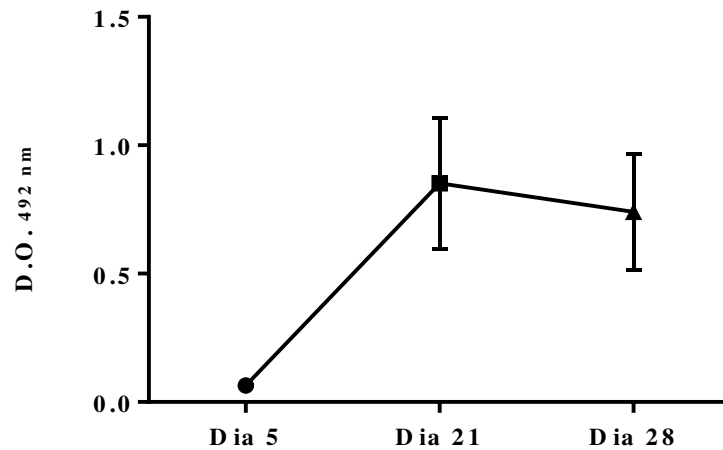


Gráfico 6 - Momentos D5, D21 e D28. Valores de absorvância de anticorpos anti-eCG nas diferentes concentrações: Grupo controle, 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL e 26 UI/mL.

Para avaliar o teste ELISA indireto qualitativo, foi realizada a plotagem dos dados das análises e divididas entre negativas e positivas para eGC. No gráfico 7, foi realizada a média dos valores de  $DO_{492nm}$  e o desvio padrão das amostras negativas (iguais ou menores que 0,0284) e positivas (iguais ou maiores que 0,0633):

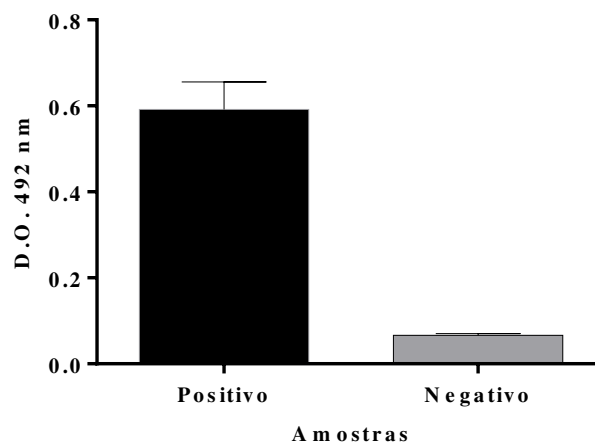


Gráfico 7 - Média da absorvância das amostras positivas e negativas para o ELISA.

A média dos valores de  $D.O._{492nm}$  e o desvio padrão das amostras negativas foram: 0,0633 e 0,0284 respectivamente. Já nas amostras positivas, a média foi de 0,591 e desvio padrão de 0,023.

O *cutoff* (gráfico 8) também foi analisado, para ser possível observar se os dados observados anteriormente podem ser considerados como positivos:

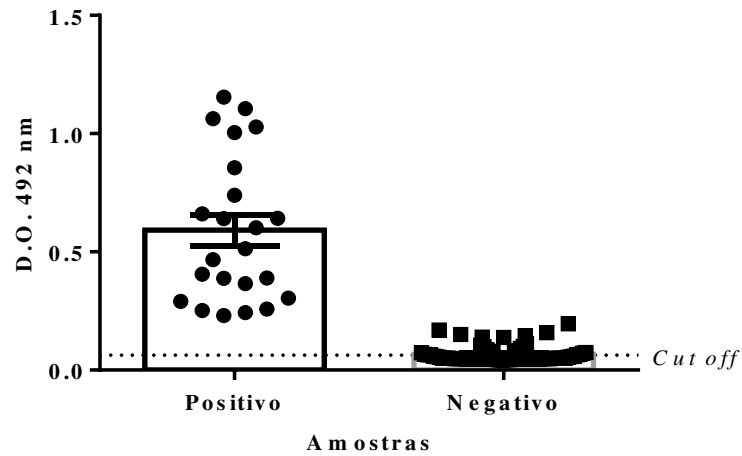


Gráfico 8 - Amostras avaliadas pelo ELISA indireto qualitativo. Negativas: amostras negativas utilizadas no cálculo do *cut off*. Positivas: amostras positivas utilizadas na a validação do teste.

O *cut off* determinado nesse estudo foi de 0,0633, dessa forma, os resultados obtidos são considerados positivos quando o valor médio das amostras são acima deste valor.

## 6. CONCLUSÕES

- Os ensaios de padronização do teste ELISA apresentaram elevada sensibilidade, principalmente nas diluições de 1/100, 1/200 e 1/400;
- As análises realizadas no momento D5 não apresentaram diferença significativa quando comparado ao grupo controle;
- Os ensaios de padronização do teste ELISA nos momentos D21 e D28 apresentaram elevada capacidade de detecção de anticorpos anti-eCG, Nas três concentrações analisadas: 11,57 UI/mL, 17,34 UI/mL e 26 UI/mL;
- Os animais tratados com o padrão PMSG apresentaram aumento de peso de ovário de forma dose-dependente.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology E-book**. [s.l.] Elsevier Health Sciences, 2014.
- ABBAS, A. K.; LITCHMAN, A. H. Basic immunology: functions and disorders of the immune system. p. 322, 2004.
- ADA, G. L.; NOSSAL, G. The Clonal-Selection Theory. **Scientific American**, v. 257, n. 2, p. 62–69, ago. 1987.
- ALLEN, W. R. et al. Influence of Maternal Size on Placental, Fetal and Postnatal Growth in the Horse. I. Development in Utero. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 123, n. 3, p. 445–453, mar. 2002.
- ALLEN, W. R.; MOOR, R. M. The Origin of the Equine Endometrial Cups. I. Production of PMSG by Fetal Trophoblast Cells. **Journal of reproduction and fertility**, v. 29, n. 2, p. 313–316, maio 1972.
- ALLEN, W. R.; STEWART, F. Equine chorionic gonadotropin. In *Equine Reproduction*. 1993.
- AYDIN, S. A Short History, Principles, and Types of ELISA, and Our Laboratory Experience with Peptide/Protein Analyses Using ELISA. **Peptides**, v. 72, p. 4–15, out. 2015.
- AYRES, H. et al. Effect of Timing of Estradiol Benzoate Administration upon Synchronization of Ovulation in Suckling Nelore Cows (*Bos Indicus*) Treated with a Progesterone-Releasing Intravaginal Device. **Animal reproduction science**, v. 109, n. 1–4, p. 77–87, dez. 2008.
- BARUSELLI, P. S. et al. The Use of Hormonal Treatments to Improve Reproductive Performance of Anestrous Beef Cattle in Tropical Climates. **Animal reproduction science**, v. 82–83, p. 479–486, jul. 2004.
- BARUSELLI, P. S. et al. Review: Using Artificial Insemination v. Natural Service in Beef Herds. **Animal : an international journal of animal bioscience**, v. 12, n. s1, p. s45–s52, jun. 2018.
- CAHOREAU, C.; COMBARNOUS, Y. Comparison of Two Reference Preparations for Horse Chorionic Gonadotrophin in Four In-Vivo and in-Vitro Assays. **Journal of reproduction and fertility**, v. 79, n. 1, p. 281–287, jan. 1987.
- CLEGG, M. T. et al. The Influence of Foetal Genotype on Equine Gonadotrophin Secretion. **The Journal of endocrinology**, v. 25, p. 245–248, out. 1962.
- CLEGG, M. T.; BODA, J. M.; COLE, H. H. The Endometrial Cups and Allantochorionic Pouches in the Mare with Emphasis on the Source of Equine Gonadotrophin. **Endocrinology**, v. 54, n. 4, p. 448–463, abr. 1954.
- COLE, H. H.; GOSS, H. The source of equine gonadotrophin. In: CALIFORNIA, U. OF (Ed.). **Press. Berkeley**. In essays ed. [s.l.: s.n.]p. 107.

COMBARNOUS, Y. et al. Choice of Protocol for the in Vivo Bioassay of Equine Chorionic Gonadotropin (ECG / PMSG) in Immature Female Rats. **Theriogenology**, v. 130, p. 99–102, maio 2019.

CROWTHER, J. R. ELISA. Theory and Practice. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 42, p. 1–218, 1995.

CROWTHER, J. R. **The ELISA Guidebook**. 1. ed. New Jersey: Humana Press, 2001.

DAVIS, D. P.; MOON, R. D. Density of itch mite, *Sarcoptes scabiei* (Acari: Sarcoptidae) and temporal development of cutaneous hypersensitivity in swine mange. **Veterinary parasitology**, v. 36, n. 3–4, p. 285–293, 1990.

DE FARIA, H. G.; STABILLE, S. R. Desempenho de ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar em crescimento alimentados com dietas extrusadas e peletizadas. **Biological Sciences**, v. 29, n. 1, p. 75–79, 2007.

DRION, P. V et al. Four Years of Induction/Synchronization of Estrus in Dairy Goats: Effect on the Evolution of ECG Binding Rate in Relation with the Parameters of Reproduction. **Reproduction, nutrition, development**, v. 41, n. 5, p. 401–412, 2001a.

DRION, P. V et al. Increase of Plasma ECG Binding Rate after Administration of Repeated High Dose of ECG to Cows. **Reproduction, nutrition, development**, v. 41, n. 3, p. 207–215, 2001b.

GINTHER, D. J. Reproductive biology of the mare. **McNaughton and Gunn, Ann Arbor, MI**, p. 268, 1979.

GONZALEZ, A. et al. Superovulation in the Cow with Pregnant Mare Serum Gonadotrophin: Effects of Dose and Antipregnant Mare Serum Gonadotrophin Serum. **The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne**, v. 35, n. 3, p. 158–162, mar. 1994. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8055430>>.

GRAKOU, A. et al. The Immunological Synapse: A Molecular Machine Controlling T Cell Activation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 285, n. 5425, p. 221–227, jul. 1999.

GRAY, D. Immunological Memory. **Annual review of immunology**, v. 11, p. 49–77, 1993.

GRAY, D.; SPRENT, J. **Immunological memory. Current Topics in Microbiology and Immunology**. [s.l.: s.n.]v. 1

HOPPEN, H. O. The Equine Placenta and Equine Chorionic Gonadotrophin--an Overview. **Experimental and clinical endocrinology**, v. 102, n. 3, p. 235–243, 1994.

IEZZI, G.; KARJALAINEN, K.; LANZAVECCHIA, A. The Duration of Antigenic Stimulation Determines the Fate of Naive and Effector T Cells. **Immunity**, v. 8, n. 1, p. 89–95, jan. 1998.

INABA, K. et al. Efficient Presentation of Phagocytosed Cellular Fragments on the Major Histocompatibility Complex Class II Products of Dendritic Cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 188, n. 11, p. 2163–2173, dez. 1998.

- JAINUDEEN, M. R. et al. Antigonadotropins in the Serum of Cows Following Repeated Therapeutic Pregnant Mare Serum Injections. **American journal of veterinary research**, v. 27, n. 118, p. 669–675, maio 1966.
- KINDT, T. J.; GOLDBSBY, R. A.; OSBORNE, B. A. **Imunologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- KOSTYK, S. K. et al. Ovulation in Immature Rats in Relation to the Time and Dose of Injected Human Chorionic Gonadotropin or Pregnant Mare Serum Gonadotropin. **Biology of reproduction**, v. 19, n. 5, p. 1102–1107, dez. 1978.
- LEA, R. G.; BOLTON, A. E. The Effect of Horse Placental Tissue Extracts and Equine Chorionic Gonadotrophin on the Proliferation of Horse Lymphocytes Stimulated in Vitro. **Journal of reproductive immunology**, v. 19, n. 1, p. 13–23, jan. 1991.
- LEGARDINIER, S. et al. Involvement of Equine Chorionic Gonadotropin (ECG) Carbohydrate Side Chains in Its Bioactivity; Lessons from Recombinant Hormone Expressed in Insect Cells. **Reproduction, nutrition, development**, v. 45, n. 3, p. 255–259, 2005.
- LEHTONEN, E.; KANKONDI, R. Rate of Gonadotrophin-Induced Abnormalities in Mouse Ova Is Related to the Site of Hormone Administration. **Journal of reproduction and fertility**, v. 80, n. 2, p. 613–617, jul. 1987.
- MACKAY, C. R. Immunological Memory. **Advances in immunology**, v. 53, p. 217–265, 1993.
- MANTECA VILANOVA, X. et al. Horse Welfare During Equine Chorionic Gonadotropin (ECG) Production. **Animals : an open access journal from MDPI**, v. 9, n. 12, dez. 2019.
- MANTOVANI, A. P. **Resposta imunológica contra gonadotrofina coriônica equina (eCG) em novilhas Bos taurus e Bos indicus**. 2010. Universidade de São Paulo, 2010.
- MELLO, R. R. C. et al. Utilização da gonadotrofina coriônica equina (eCG) em protocolos de sincronização da ovulação para IATF em bovinos: revisão. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 38, p. 129–134, 2014.
- MOOR, R. M.; ALLEN, W. R.; HAMILTON, D. W. Origin and Histogenesis of Equine Endometrial Cups. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, n. 23, p. 391–395, out. 1975.
- MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine Chorionic Gonadotropin. **Endocrine reviews**, v. 12, n. 1, p. 27–44, fev. 1991.
- NUNES, G. S. Immunochemical methods for analysis of environmental contaminants: concepts, state of the art and perspectives. **Química Nova**, v. 28, p. 462–471, 2005.
- O'DONOVAN, O.; MADDEN, D. Why Do Medical Professional Regulators Dismiss Most Complaints From Members of the Public? Regulatory Illiteracy, Epistemic Injustice, and Symbolic Power. **Journal of bioethical inquiry**, v. 15, n. 3, p. 469–478, set. 2018.

- PAPKOFF, H.; SAMY, T. S. Isolation and Partial Characterization of the Polypeptide Chains of Ovine Interstitial Cell-Stimulating Hormone. **Biochimica et biophysica acta**, v. 147, n. 1, p. 175–177, set. 1967.
- PIERCE, J. G.; PARSONS, T. F. Glycoprotein Hormones: Structure and Function. **Annual Review of Biochemistry**, v. 50, p. 465–495, 1981.
- PRATA, A. B. et al. Fertilidade de vacas leiteiras mestiças submetidas à IATF com eCG incorporado ao protocolo. **Anim. Reprod**, v. 11, p. 200, 2014.
- PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of Ovulation in Dairy Cows Using PGF<sub>2</sub>alpha and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915–923, nov. 1995.
- RAFERT, S. et al. Involvement of Ovarian Estradiol Biosynthesis and Pituitary FSH Expression in the Mechanism of Human Chorionic Gonadotropin Stimulation of Uterine Growth in Immature Female Rats. **Journal of Hormones**, v. 2016, p. 6923239, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2016/6923239>>.
- RIZZO, A. et al. Follicular Development in Pregnant Cows after the Administration of Equine Chorionic Gonadotropin (ECG): A New Insight. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 31, n. 4, p. 536–542, 2009.
- ROY, F. et al. The Negative Effect of Repeated Equine Chorionic Gonadotropin Treatment on Subsequent Fertility in Alpine Goats Is Due to a Humoral Immune Response Involving the Major Histocompatibility Complex. **Biology of reproduction**, v. 60, n. 4, p. 805–813, abr. 1999.
- SALES, J. N. S. et al. Effect of Circulating Progesterone Concentration during Synchronization for Fixed-Time Artificial Insemination on Ovulation and Fertility in Bos Indicus (Nelore) Beef Cows. **Theriogenology**, v. 83, n. 6, p. 1093–1100, abr. 2015.
- SHAH, K.; MAGHSOUDLOU, P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA): The Basics. **British journal of hospital medicine (London, England : 2005)**, v. 77, n. 7, p. C98-101, jul. 2016.
- SPRENT, J. T and B Memory Cells. **Cell**, v. 76, n. 2, p. 315–322, jan. 1994.
- STEWART, F.; ALLEN, W. R.; MOOR, R. M. Pregnant Mare Serum Gonadotrophin: Ratio of Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone Activities Measured by Radioreceptor Assay. **The Journal of endocrinology**, v. 71, n. 3, p. 471–482, dez. 1976.
- SWANSON, W. F. et al. Kinetics of the Humoral Immune Response to Multiple Treatments with Exogenous Gonadotropins and Relation to Ovarian Responsiveness in Domestic Cats. **American journal of veterinary research**, v. 57, n. 3, p. 302–307, mar. 1996.
- THEAU-CLÉMENT, M. et al. Evolution of Anti-ECG Antibodies in Response to ECG Doses and Number of Injections. Relationship with Productivity of Rabbit Does. **Animal : an international journal of animal bioscience**, v. 2, n. 5, p. 746–751, maio 2008.
- TIGHE, P. J. et al. ELISA in the Multiplex Era: Potentials and Pitfalls. **Proteomics. Clinical applications**, v. 9, n. 3–4, p. 406–422, abr. 2015.

VASCONCELOS, J.; VILELA, E.; SÁ FILHO, M. Temporary weaning of calves at two different times of the GnRH-PGF(2 alpha)-EB synchronization protocol for ovulation in post-partum Nelore cows. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 95–103, 1 fev. 2009.

WALTON, E. A.; ARMSTRONG, D. T. Ovarian Function and Early Embryo Development in Immature Rats given a Superovulatory Dose of PMSG, Later Neutralized by Antiserum. **Biology of reproduction**, v. 25, n. 2, p. 272–280, set. 1981.

WOLFENSON, D. et al. The Effect of a GnRH Analogue on the Dynamics of Follicular Development and Synchronization of Estrus in Lactating Cyclic Dairy Cows. **Theriogenology**, v. 42, n. 4, p. 633–644, set. 1994.

## ANEXO I



Versão 1.1 jan/2013

**OUROFINO AGRONEGÓCIO LTDA.  
OUROFINO SAÚDE ANIMAL LTDA.**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA-OF****CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado “**PADRONIZAÇÃO DO TESTE ELISA PARA AVALIAÇÃO IMUNOGÊNICA DE FORMULADOS COMERCIAIS DE GONODOTROFINA CORIÔNICA EQUINA (eCG) EM PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO EM RATAS (*Rattus norvegicus*)**” protocolo nº **084/2021**, sob a responsabilidade do Sr. (a) Osmar Dias Ferraz Junior, CPF/MF nº 099.419.796-93 e registro no Conselho de Classe (CRMV) nº SP 48.038 que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-OF) em 04 de agosto de 2021.

Dados do projeto:

Finalidade	( ) Ensino	( X ) Pesquisa Científica
Número de animais	80	
Espécie	Ratas	
Raça/linhagem	<i>Wistar</i>	
Sexo	Fêmeas	
Peso médio	40 - 50 gramas	
Idade	24 dias	
Origem	Anilab	
Vigência da autorização	3 meses (fica assim definido pela comissão)	

Eventuais alterações no protocolo devem ser oficializadas através de emenda e submetidas à nova aprovação por esta CEUA.

Um relatório deve ser encaminhado ao final do projeto (para estudos com menos de 06 meses de duração) ou semestralmente (para estudos com mais de 06 meses de duração).

Ribeirão Preto, 04 de agosto de 2021.


 Vanessa Garcia Rizzi Mussi

Coordenadora da CEUA